

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen
Tbtri5 de *Trichoderma brevicompactum*

Anamariela Tijerino Ayala

2010

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen
Tbtri5 de *Trichoderma brevicompactum*

Memoria presentada por Anamariela Tijerino Ayala para optar al grado de Doctor por
la Universidad de Salamanca

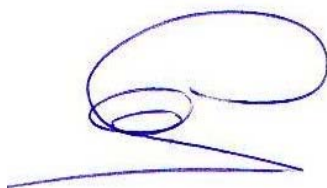
Salamanca, 20 de julio 2010

Enrique Monte Vázquez, Catedrático de Microbiología en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y **M. Rosa Hermosa Prieto**, Profesora Titular de Microbiología del mismo Departamento,

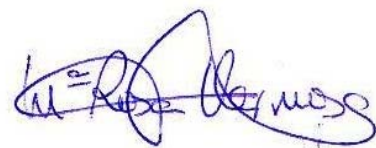
CERTIFICAMOS:

Que la memoria titulada “**Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Tbtri5* de *Trichoderma brevicompactum***”, presentada por Anamariela Tijerino Ayala para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos este certificado en Salamanca a 20 de julio de 2010.

A stylized, handwritten signature in blue ink, consisting of a large, looping 'E' followed by a horizontal line.

Fdo.: Enrique Monte Vázquez

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Rosa Hermosa Prieto' with a stylized flourish at the end.

Fdo.: M. Rosa Hermosa Prieto

Ángel Domínguez Olavarri, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Tbtri5* de *Trichoderma brevicompactum***”, presentada por Anamariela Tijerino Ayala para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. Enrique Monte Vázquez y M. Rosa Hermosa Prieto, en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo este certificado en Salamanca a 20 de julio de 2010.

Fdo.: Ángel Domínguez Olavarri

A Dios

A Carlos Manuel

A mis papás, hermanas, cuñados

A Alejandro, Adrián y Mónica

A nuestros futuros pequeños angelitos

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Monte, por permitirme participar en su grupo de investigación. Por las reuniones y consejos en la dirección de esta tesis, las clases de historia y las de fútbol. Pero sobre todo, por la dedicación en la asesoría y revisión de este trabajo.

A la Dra. Rosa Hermosa, por la dirección de esta tesis doctoral. Por dedicar tiempo a enseñarme biología molecular, por darme siempre guías de trabajo y por su gran paciencia para que se pudiese culminar este proyecto.

Al Dr. Enrique García Sánchez, por recibirme en Microbiología, y por apoyarme profesional y emocionalmente para poder seguir adelante.

A los (as) Drs (as) del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica: José Ángel García Rodríguez, Luis Félix Valero Juan, Juan Luis Muñoz Bellido, María José Fresnadillo Martínez y Ramona Mateos Campos, quienes de una u otra forma me han dado la mano y me han apoyado durante estos tres años.

Al Dr. Jesús San Miguel Izquierdo, porque sin conocerme me dio la oportunidad e hizo posible una experiencia que siempre recordaré.

A las personas que me ha ayudado, explicado y aconsejado en el trabajo, para que al fin esta tesis haya tomado forma: Al personal del laboratorio de Ponferrada: Dr. Santiago Gutiérrez, Rosa E Cardoza y Mónica. Al personal del laboratorio de Cádiz: Dr. Isidro González y Javier. A Ricardo y Bea del laboratorio 4. Al Dr. Fernando Pelaéz, Dra. Francisca Vicente, Mercedes, Cartu, Nuri y demás amigos de los laboratorios Merck. Gracias por el apoyo en la parte técnica de laboratorio y la ayuda en el análisis de los resultados, por la hospitalidad en el tiempo que estuvimos colaborando, y por mantener la amistad. Porque sin ustedes esta tesis no habría sido lo que es.

A mis compañeras y amigas: Sarita, Ila, Joanita, Eugenia, Marta, Isabel y mi compañero y amigo Jorge, por el apoyo emocional y psicológico que me han dado durante estos tres largos años. Por ustedes este tiempo en el laboratorio ha sido más bonito. A todos, gracias por la compañía en el lab, los almuerzos, los cafés, las confidencias, los consejos, los paseos de cinco kilómetros en bici, los cigarros, y las copas, pero sobre todo gracias por la amistad. A la demás gente del laboratorio, Belén, Carlos Nicolás, Thais, Vega, Raúl, Jose, Lina y demás compañeros de pasillos. No me extrañen que posiblemente nos veamos en algún otro rincón del mundo.

A la Dra. Patricia Allen, por confiar en mis aptitudes y el apoyo brindado desde un inicio. Por mantener siempre abiertas las puertas de su despacho y las del INCIENSA.

A la Dra. Lissette Navas, por su confianza y por permitirme cumplir con este reto académico.

A las Dras. Elena Campos, Hilda Bolaños y Teresa Acuña, por apoyarme en esta decisión personal y profesional. Por recibirme cada diciembre, aunque sea por un día de visita en el laboratorio, preocuparse y preguntarme por como iban saliendo los resultados de mi tesis y hacerme sentir siempre como parte del CNRB.

Al Dr. Carlos Trabado, por creer en mí y dejar que los trámites de mi permiso siguieran su curso, por su amistad y sus consejos, y por hacerme reír siempre.

A Xinita, por que sé que corrió con mis papeles de permiso. A Marisol y las chicas de Recursos humanos por todos los trámites realizados.

A mi buen amigo Jose Luis; por no olvidarse de mí. A tía Olguis, Luzmi, Francisco, Isis, Gletty, Gre y a todos mis amigos (as) y compañeros (as) del CNRB y del INCIENSA que han estado siempre en contacto.

A Carlos Manuel, mi esposo, por escucharme en cada momento, por soportar mi mal genio después de pasar un mal día, por dejar que me desahogara contigo, por darme consejos de cómo sobrellevarlo, por decirme siempre “después de la tormenta siempre llega la calma”, por hacer que creyera en ti, por hacerme reír. Por traerme a un desierto en medio de la nada, con un clima extremo, una maravillosa catedral, una plaza espectacular y la mejor compañía del mundo.

A mi papá y mi mamá, por aceptar mis llamadas cada fin de semana durante tres años, así la vida es más fácil al otro lado del Atlántico. A mis hermanas y cuñados por no extrañarme tanto, y a mis tres sobrinos Alejandro, Adrián y Mónica por escribirme cartas, dibujos, mandarme fotos, y hablar conmigo. Como se los prometí, al fin para este diciembre me quedo en casita y ya no me vuelvo a ir. A todos gracias, porque durante este tiempo me han dado la fortaleza para cumplir con esta etapa.

A las instituciones que han dado soporte económico para poder cumplir con este proyecto: Junta de Castilla y León, Ministerio Español de Ciencias e Innovación, Agencia de Coooperación Española Internacional.

A aquellos que me han enseñado una lección de vida durante estos años...

Finalmente, Gracias a Dios por permitirme llegar hasta este momento.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABA	ácido absícico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
ARNasa	ribonucleasa
AS	acetosiringona
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
atm	atmósfera
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
BPE	extracto de pituitaria bovina
°C	grado centígrado
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CIA	cloroformo-alcohol isoamílico
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
c.s.p	cantidad suficiente para
CWDEs	<i>cell wall degrading enzymes</i>
CYS80	sacarosa, harina de maíz amarillo, extracto de levadura
DRC	curva sigmoidal de dosis-respuesta
DEPC	dietil pirocarbonato
DMAPP	dimetilalil difosfato
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
D.O.	densidad óptica
DXP	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato
EBI	Instituto europeo de bioinformática
EDTA	tetra-acetato di-etileno disódico
EE.UU.	Estados Unidos
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>
FPP	farnesil difosfato
g/L	gramo por litro
g	gramo
h	horas
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
GGPP	geranilgeranil difosfato
GPP	geranil difosfato
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IBT	<i>Culture Collection, Department of Biotechnology, Technical University of Denmark</i>
IC	índice celular
IMI	<i>International Mycological Institute</i>

IPP	isopentil difosfato
IPTG	isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
ITEM	<i>Collection of Institute of Sciences of Food Production CNR</i>
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
Kb	kilobase
Kg	kilogramo
kV	kilovoltio
k Ω	kiloohmio
L	litro
M	molaridad
MAMPs	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MEP	metileritriol fosfato
mg	miligramo
mg/mL	miligramo por mililitro
mL	mililitro
mM	milimolar
MMS	metil metano sulfonato
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente
MSD	<i>Merck Sharp & Dohme</i>
MTT	<i>thiazolil blue tetrazolium bromide</i>
MVA	ácido mevalónico
NBT	<i>NewBiotechnic, S.A.</i>
NCBI	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>
NJ	<i>neighbour-joining</i>
NRPSs	péptido sintetasas no ribosómicas
nm	nanómetro
ng/mL	nanogramo por mililitro
ORF	fase de lectura abierta
pb	pares de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>potato dextrose broth</i>
PKSs	poliquétido sintasas
ppm	partes por millón
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA-PCR</i>
rpm	revoluciones por minuto
RFLPs	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RTCA	<i>real-time cell analyzer</i>
SCAR	<i>sequence-characterized amplified region</i>
SDS	dodecilsulfato sódico
SMART	<i>simple modular architecture research tool</i>
spp.	especies

Tris	tri-(hidroximetil) aminometano
TSA	agar tripticasa soja
μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
μg/mL	microgramo por mililitro
μg/L	microgramo por litro
UFC/mL	unidades formadoras de colonias por mililitro
UV	ultravioleta
V	voltios
WT	<i>wild type</i>
x	número de veces de concentración
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranósido

AMINOÁCIDOS

A (Ala)	Alanina
C (Cys)	Cisteína
D (Asp)	Ácido aspártico
E (Glu)	Ácido glutámico
F (Phe)	Fenilalanina
G (Gly)	Glicina
H (His)	Histidina
I (Ile)	Isoleucina
K (Lys)	Lisina
L (Leu)	Leucina
M (Met)	Metionina
N (Asn)	Asparagina
P (Pro)	Prolina
Q (Gln)	Glutamina
R (Arg)	Arginina
S (Ser)	Serina
T (Thr)	Treonina
V (Val)	Valina
W (Trp)	Triptofano
Y (Tyr)	Tirosina

BASES NITROGENADAS

A	Adenina
C	Citocina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo
I	Inosina
R	G/A
Y	C/T
W	A/T
S	G/C
K	G/T
M	A/C
B	C/G/T, pero no A
D	A/G/T, pero no C
H	C/G/A, pero no G
V	C/G/A, pero no T
N	A/C/G/T

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Biología del género <i>Trichoderma</i>	3
1.1. Morfología y taxonomía	3
1.2. Ecología	6
2. Aplicaciones del género <i>Trichoderma</i>	7
3. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> como agente de control biológico	7
3.1. Micoparasitismo	8
3.2. Competencia por distintos recursos	10
3.3. Promoción del crecimiento de las plantas	11
3.4. Inducción de mecanismos de defensa de las plantas	11
3.5. Antibiosis	12
4. Metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i>	12
4.1. Peptaiboles	13
4.2. Poliquétidos	14
4.3. Terpenos	15
4.3.1 Biosíntesis de compuestos terpénicos	16
i) Síntesis del precursor isopentil difosfato (IPP)	16
ii) Adición repetitiva de IPP para formar homólogos prenil difosfato	17
iii) Conversión del prenil difosfato por terpeno sintetasas específicas en la producción de esqueletos terpénicos	17
iv) Modificaciones enzimáticas secundarias del esqueleto de carbono para dar los diferentes productos naturales	18
4.3.2. Tipos de compuestos terpénicos	19
i) Hemiterpenos, monoterpenos y diterpenos	19
ii) Triterpenos y esteroides	19
iii) Sesquiterpenos	20
4.3.3. Regulación de la biosíntesis de trichotecenos	22
5. Genómica funcional	25
5.1. Concepto	25
5.2. Genómica funcional de hongos filamentosos	26
5.3. Genómica funcional de <i>Trichoderma</i>	27
6. Estrategias para el estudio de la función génica	28
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Organismos utilizados	37
1.1. Bacterias	37
1.2. Cepas de levaduras	37

1.3. Hongos filamentosos	38
1.3.1. Cepas de <i>Trichoderma</i>	38
1.3.2. Hongos fitopatógenos	39
1.3.3. Otros hongos filamentosos	39
1.4. Líneas celulares	39
1.5. Material vegetal	39
2. Vectores utilizados	40
2.1. Vectores plasmídicos	40
2.2. Vectores fágicos	41
3. Medios de cultivo	42
3.1. Medios de cultivo para bacterias	42
3.2. Medios de cultivo para hongos y levaduras	45
3.3. Medios de cultivo utilizados para líneas celulares	48
3.4. Medios de cultivo para plantas	49
4. Cultivo de los microorganismos	49
4.1. <i>Trichoderma</i>	49
4.1.1 Recogida de esporas	49
4.1.2. Cultivo para la extracción de ADN	50
4.1.3 Cultivo para el análisis de la expresión génica	50
4.2. <i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>manitu</i> híbrido	50
4.2.1. Desinfección de semillas	50
5. Mantenimiento de los microorganismos	51
5.1. Bacterias	51
5.2. Hongos filamentosos	51
5.3. Plantas	51
6. Construcción de vectores	51
6.1. Construcción del vector pURSPT5	51
7. Transformación de microorganismos	52
7.1. Transformación de bacterias	52
7.1.1. <i>E. coli</i>	52
7.1.1.1. Preparación de células competentes	52
7.1.1.2. Transformación	53
7.1.2. <i>A. tumefaciens</i>	54
7.1.2.1. Preparación de células competentes	54
7.1.2.2. Transformación	54
7.2. Transformación de hongos filamentosos	55
7.2.1. Preparación de <i>A. tumefaciens</i>	55
7.2.2. Transformación	55
7.2.3. Selección de los transformantes	56
8. Extracción de ácidos nucleicos	56
8.1. Extracción de ADN	56

8.1.1. Extracción de ADN genómico de <i>Trichoderma</i>	56
8.1.1.1. Extracción a gran escala	56
8.2. Extracción de ARN de <i>Trichoderma</i>	57
8.2.1. Método del TRI Reagent®	57
9. Manipulación de ácidos nucleicos	58
9.1. Cuantificación y calidad de los ácidos nucleicos	58
9.1.1. En ensayos generales	58
9.2. Manipulación enzimática de ácidos nucleicos	58
9.2.1. Tratamiento enzimático de ADN	58
9.2.1.1. Digestión	58
9.2.1.2. Generación de extremos romos	59
9.2.1.3. Ligación	59
9.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	59
9.3.1. Reacción clásica	59
9.3.2. RT-PCR	60
9.3.3. PCR a tiempo real (<i>Real time</i> -PCR)	60
9.3.4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo	61
9.4. Electroforesis de ácidos nucleicos	63
9.4.1. Electroforesis de ADN	63
9.4.2. Electroforesis de ARN	63
9.4.2.1. En condiciones no desnaturalizantes (geles de agarosa)	64
9.5. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	64
9.6. Secuenciación de ADN	64
10. Experimentos de hibridación en membrana	64
10.1. Transferencia de ADN de geles de agarosa (<i>Southern blot</i>)	64
10.2. Marcaje no radiactivo de ADN	65
10.3. Prehibridación, hibridación y lavados	65
10.3.1. Prehibridación	65
10.3.2. Hibridación y lavados	65
10.3.2.1. Hibridación con sondas no radiactivas	66
10.4. Detección	66
10.4.1. No radiactiva	66
10.5. Reutilización de membranas (Hibridación no radioactiva)	67
11. Aislamiento de metabolitos secundarios	67
11.1. Preparación de cultivos de fermentación	67
11.2. Aislamiento de metabolitos	67
11.2.1. Extracción orgánica	67
11.2.2. Cromatografía en capa fina (CCF)	68
11.2.3. Cromatografía en columna (CC)	68
11.2.4. Cromatografía en placa preparativa (CP)	68
11.2.5. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	68

11.2.6. Resonancia magnética nuclear (RMN)	69
12. Determinación de actividad antimicrobiana	69
12.1. Bioensayo frente a <i>S. cerevisiae</i> CECT 1383 y <i>K. marxianus</i> CECT 1018	69
12.2. Actividad antimicrobiana de extractos acetónicos de <i>T. brevicompactum</i>	70
12.2.1 Preparación de extractos acetónicos	70
12.2.2. Ensayos con extractos acetónicos en medio sólido	71
12.2.3. Ensayos con extractos acetónicos en medio líquido	71
12.2.4. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)	72
12.3. Actividad antimicrobiana de fracciones puras de <i>T. brevicompactum</i>	73
13. Determinación de actividad antitumoral y citotóxica frente a líneas celulares	74
13.1. Preparación de las líneas celulares	74
13.2. Determinación de la dosis efectiva 50 (DE50) de los extratos acetónicos	74
13.3. Determinación de la dosis efectiva 50 (DE50) de trichodermina y de tirosol	76
13.4. Ensayo de actividad citotóxica de la trichodermina y el tirosol	76
13.5. Mecanismo de acción antitumoral de la trichodermina	77
13.6. Ensayo de reversión de morfología celular	78
14. Ensayos antifúngicos	78
14.1. Ensayo en cultivos duales	78
14.2. Ensayos “ <i>in vivo</i> ”: <i>T. brevicompactum</i> -tomate- <i>B. cinerea</i>	78
15. Ensayos de germinación y crecimiento de la planta	79
15.1. Ensayos de germinación	79
15.2. Ensayo de crecimiento	79
15.2.1. Ensayo “ <i>in vitro</i> ”	80
15.2.2. Ensayo “ <i>in vivo</i> ”	80
16. Herramientas bioinformáticas y software utilizados	80
16.1. Búsqueda de secuencias similares en bases de datos	80
16.1.1. FASTA	80
16.1.2. BLAST	81
16.2. Alineamiento de secuencias	81
16.3. Otras manipulaciones de secuencias	81
16.4. Análisis estructural de proteínas	82
16.5. Análisis de los dominios de unión a factores de transcripción	82
16.6. Otras herramientas de predicción	82
16.7. Análisis filogenéticos	83
16.8. Análisis estadístico	83
16.9. Herramientas de edición	83
17. Casas comerciales y proveedores	84
RESULTADOS	87
1. Síntesis de terpenos: Resultados previos	89

2. El gen <i>Tbtri5</i> de <i>T. brevicompactum</i> IBT 40841	90
2.1. Estudio de la secuencia del promotor de <i>Tbtri5</i>	90
2.2. Análisis de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína TbTRI5	93
2.3. Análisis filogenético	98
2.4. Estudio de la expresión del gen <i>Tbtri5</i>	99
2.5. Análisis <i>Southern</i> de <i>Tbtri5</i> . Presencia en otras cepas de <i>Trichoderma</i>	102
3. Análisis funcional del gen <i>Tbtri5</i> de <i>T. brevicompactum</i> IBT 40841	104
3.1. Obtención de cepas de <i>T. brevicompactum</i> IBT40841 que sobreexpresan el gen <i>Tbtri5</i>	104
3.2. Caracterización de las cepas transformadas con pURSPT5	104
3.2.1. Comprobación y selección de los transformantes	104
3.2.2. Confirmación de los transformantes: análisis tipo <i>Southern</i>	105
3.2.3. Análisis de la expresión de <i>Tbtri5</i> en los transformantes seleccionados	107
3.2.4. Influencia de la sobreexpresión de <i>Tbtri5</i> en la producción de metabolitos secundarios	109
3.2.5. Ensayos de actividad antimicrobiana	115
3.2.5.1. Ensayos con extractos acetónicos en medio sólido	115
3.2.5.2. Ensayos con extractos acetónicos en medio líquido	118
3.2.5.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos acetónicos	118
3.2.5.4. Ensayos con metabolitos secundarios	119
3.2.6. Ensayos de actividad antitumoral y citotóxica	122
3.2.6.1. Actividad antitumoral de extractos acetónicos	122
3.2.6.2. Citotoxicidad de los extractos acetónicos	123
3.2.6.3. Actividad antitumoral y citotoxicidad de los metabolitos secundarios	125
3.2.6.4. Mecanismo de acción antitumoral de la trichodermina	128
3.2.7. Ensayos antifúngicos	130
3.2.7.1. Ensayo en cultivos duales	130
3.2.7.2. Ensayos " <i>in vivo</i> ": <i>T. brevicompactum</i> -tomate- <i>B. cinerea</i>	130
3.2.8. Ensayos de germinación	131
3.2.9. Efecto sobre el crecimiento de la planta	132
3.2.9.1. Ensayo " <i>in vitro</i> "	132
3.2.9.2. Ensayo " <i>in vivo</i> "	133
4. Análisis del cluster de genes <i>tri</i> en <i>T. brevicompactum</i> IBT 40841	135
4.1. Efecto de la sobreexpresión del gen <i>Tbtri5</i> en la expresión de otros genes de la ruta biosintética de los trichotecenos	137
4.2. Efecto de la sobreexpresión del gen <i>Tbtri5</i> en la expresión de un gen de la ruta biosintética de ergosterol, el <i>erg1</i>	140
DISCUSIÓN	143
CONCLUSIONES	163
APÉNDICE	167

1. Secuencia del gen <i>Tbtri5</i> , y parte de su promotor	169
2. Secuencia del gen <i>tri4</i>	170
3. Secuencia del gen <i>tri6</i>	171
4. Secuencia del gen <i>tri14</i>	171
 BIBLIOGRAFÍA	 173

INTRODUCCIÓN

1. BIOLOGÍA DEL GÉNERO *Trichoderma*

1.1. Morfología y taxonomía

Trichoderma agrupa hongos filamentosos anamórficos o imperfectos (mitóticos) que de forma artificial han venido clasificándose en la División Deuteromicota (Gams y col., 1987) y dentro de ésta, en la clase de los Hifomicetos. Se reproducen de forma asexual mediante un ciclo en el que alternan micelios y esporas (conidios). Estas estructuras asexuales se forman a partir de células desnudas, sin la envoltura adicional de un cuerpo fructífero (Webster, 1980). En algunos aislamientos se ha descrito el estado perfecto, sexual o teleomorfo (meiótico), dentro del género *Hypocrea* y géneros relacionados como *Podostroma*, *Sarawakus*, *Aphysiostroma* y *Protocrea* (Druzhinina y Kubicek, 2005; Samuels, 2006), demostrando que las especies del género *Trichoderma* son un grupo de derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual (Kuhls y col., 1996). En este sentido, se ha identificado a *Hypocrea lixii* como el estado teleomorfo de *Trichoderma harzianum*, *H. atroviridis* como teleomorfo de *T. atroviride*, e *H. virens* como teleomorfo de *T. virens* (Chaverri y col., 2001 y 2003; Dodd y col., 2003), tres de las especies del género más usadas en el control biológico (Monte, 2001).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente sobre sustratos muy diversos y emiten grandes cantidades de conidios verdes, excepcionalmente blancos, formados a partir de células conidiógenas enteroblásticas fialídicas (Figura 1) (Kirk y col., 2001). Los conidióforos son muy ramificados (asemejándose a arbustos con forma piramidal), están tabicados y sus células contienen más de un núcleo. Los conidios son ovoides, con pared normalmente lisa y con un solo núcleo. En determinadas condiciones de estrés, ya sea nutricional o por desecación, se forman sobre el micelio unas estructuras asexuales de resistencia denominadas clamidosporas. Estas estructuras son globosas, con pared rugosa y más gruesa que la de los conidios, y tienen gran importancia en la supervivencia del hongo (Lewis y Papavizas, 1984). El número de cromosomas por núcleo y el tamaño del genoma varían según la especie, de 3 a 7 y de 30,5 a 38,8 Mb, respectivamente (Goldman y col., 1998; Martínez y col., 2008).

El género *Trichoderma* se describió hace más de 200 años (Persoon, 1794). Desde entonces y hasta la llegada de las técnicas moleculares, la taxonomía del género se basó en criterios morfológicos, que son herramientas subjetivas, imprecisas e ineficaces cuando se trata de diferenciar especies o clasificar nuevos aislamientos dentro de este género.

Entre las primeras clasificaciones, basadas en criterios morfológicos, se encuentran las de Rifai (1969) y Bisset (1991). Rifai estableció nueve “agregados específicos”, en cada uno de los cuales encuadró especies filogenéticamente distintas pero con una morfología similar.

Más tarde, Bisset revisó las especies de *Trichoderma* existentes, los “agregados específicos” y algunas formas anamórficas de *Hypocrea*, y propuso la división del género *Trichoderma* en cinco nuevas secciones: TRICHODERMA, PACHYBASYUM, LONGIBRACHIATUM, SATURNISPORUM E HYPOCREARUM (Bisset, 1991).

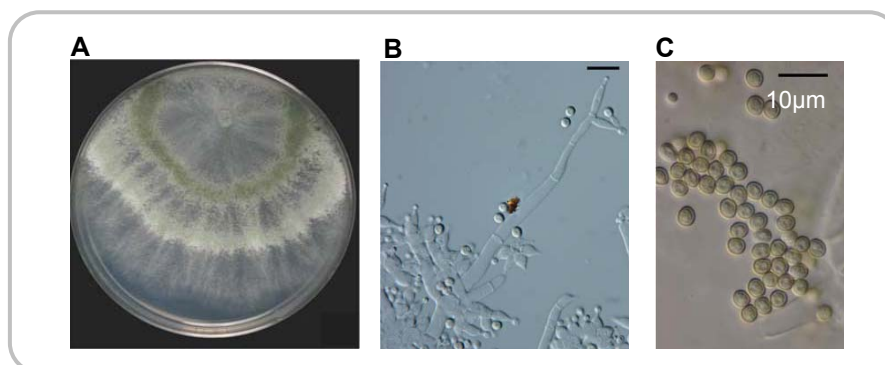


Figura 1. Morfología de *Trichoderma*. Aspecto que presenta una colonia de *T. brevicompactum* en medio PDA (A), conidióforo al microscopio de contraste de fase (B), y conidios al microscopio electrónico de barrido (C). Tomado de Degenkolb y col. (2008a).

Los primeros estudios orientados a caracterizar cepas de *Trichoderma*, no basados en criterios morfológicos, aplicaron características fisiológicas y/o bioquímicas (Zamir y Chet, 1985; Stasz y col., 1989; Grondona y col., 1997). Actualmente, el uso de técnicas moleculares como RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), perfiles RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA-PCR*), secuencias de distintas zonas del genoma o marcadores SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*) se están imponiendo, para la identificación de cepas, la sistemática del género y la monitorización de agentes de biocontrol (Muthumeenakshi y col., 1994; Arisan-Atac y col., 1995; Hermosa y col., 2000 y 2001; Rubio y col., 2005).

Particularmente útiles resultan los datos de secuencias obtenidos de las regiones ITS (*internal transcribed spacer*) y de genes como los que codifican el factor de elongación de la transcripción 1- α (*tef1*) o la endoquitinasa 42 (*ech42*), o el ADNr 18S y el ADNr 28S, ya que han permitido establecer taxones moleculares (Kullning-Gradinger y col., 2000; Kubicek y col., 2003), describir nuevas especies como *T. asperellum* (Lieckfeldt y col., 1999) o *T. pleurotum* (Komon-Zelazowska y col., 2007), relacionar especies como *T. harzianum* con su fase sexual *H. lixii* (Chaverri y col., 2003), o distinguir y tipificar aquellas formas que son dañinas para los cultivos de champiñón (Hermosa y col., 2000).

En la actualidad, se aceptan trece grupos o “clades” dentro del género *Trichoderma* (Figura 2): CERAMICA, HARZIANUM, STROMATICUM, BREVICOMPACTUM, VIRIDE, MINUTISPORUM, MEGALOCITRINA, LUTEA, SEMIORBIS, CHLOROSPORA, STRICTIPILE y LONGIBRACHIATUM (Samuels, 2006; Degenkolb y col., 2008a); aunque en los últimos 20

años, como consecuencia del uso de las técnicas de biología molecular y de la continua búsqueda de aislamientos en nuevos ecosistemas, la sistemática de este género está sometida a continuos cambios.

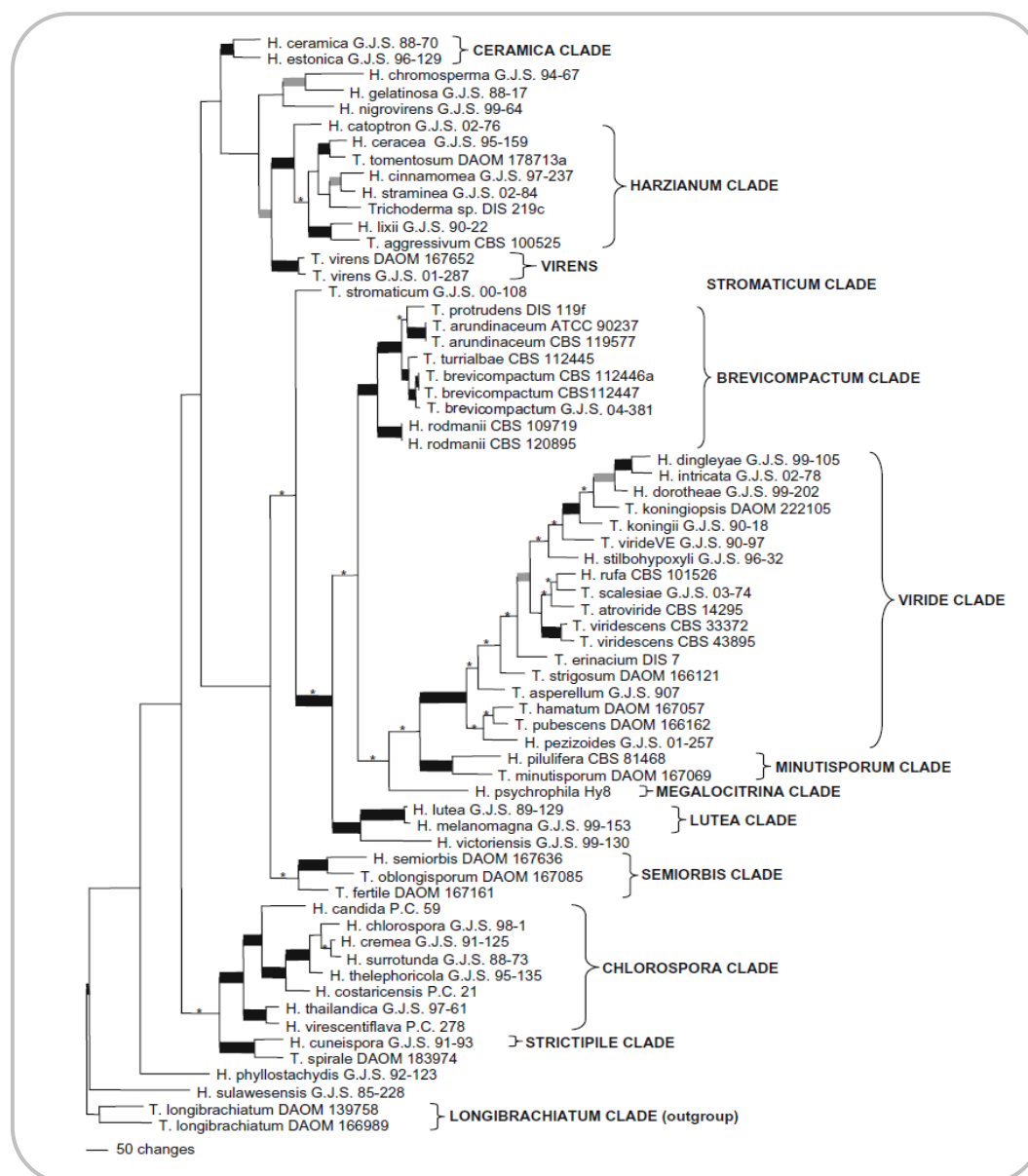


Figura 2. Grupos moleculares descritos en el género *Trichoderma*. Este árbol se obtuvo tras un análisis filogenético de las secuencias de los genes de la subunidad II de la ARN polimerasa (*rpb2*), el factor de elongación de la transcripción 1- α (*tef1*) y los espaciadores de transcripción interna ITS1 e ITS2. Tomado de Degenkolb y col. (2008a).

Particularmente, el término *T. brevicompactum* se usó por primera vez por Kraus y col. (2004) para definir las cepas “*Trichoderma* sp. 1” (Kullnig-Gradinger y col., 2002) aisladas en América y en el sureste asiático, que tras ser caracterizadas en base a criterios morfológicos, fisiológicos (utilización de fuentes de carbono) y moleculares, quedaban localizadas dentro de

la antigua sección PACHYBASIIUM, pero separadas de especies previamente descritas como *T. harzianum*.

Recientemente (Degenkolb y col., 2008a; Degenkolb y col., 2008b), el grupo BREVICOMPACTUM ha sido reconocido, en base a criterios morfológicos, fisiológicos (producción de metabolitos secundarios) y moleculares, como una línea separada de la antigua sección TRICHODERMA (Bisset, 1991) que, a su vez, se divide en tres subgrupos principales: uno que incluye las especies *T. brevicompactum* y *T. turrialbense*, el segundo con *T. arundinaceum* y *T. protrudens*, y el tercero con *H. rodmanii* (Figura 2).

1.2. Ecología

El género *Trichoderma* incluye hongos de rápido crecimiento que aunque son habituales de suelos forestales, agrícolas y pastizales, se han aislado en todos los continentes (Hermosa y col., 2004; Sadfi-Zouaoui y col., 2009). Los sustratos que *Trichoderma* puede utilizar en su crecimiento son muy variados, aunque muestra preferencia por los suelos ácidos y ricos en materia orgánica, siendo el hierro un elemento esencial para su correcto desarrollo (Klein y Eveleigh, 1998).

Hay que destacar que las cepas del grupo BREVICOMPACTUM se caracterizan por utilizar la mayoría de los carbohidratos (mono-, oligo- y polisacáridos como D-glucosa-1-fosfato, maltosa o furanosa) y carbohidratos compuestos (polioles), así como, aminoácidos (adenosina-5'-monofosfato) y ácidos orgánicos, de forma mucho más eficiente que otras especies del género *Trichoderma*. Sin embargo, *T. brevicompactum* no es capaz de asimilar compuestos como sacarosa, ácido D-glucónico, L-alaninamida, ester metílico del ácido D-láctico, 2-aminoetanol, uridina, D-melecitosa, glucuronamida, N-acetil-D-manosamina, N-acetil-D-galactosamina, heptulosa, palatinosa, α -ciclodextrina y maltitol (Kraus y col., 2004).

En cuanto a los parámetros ambientales necesarios para su crecimiento, *Trichoderma* puede crecer dentro de un amplio rango de temperaturas, aunque la especie *T. brevicompactum* se diferencia de otras especies de *Trichoderma* porque tiene un crecimiento mucho más lento, con temperaturas de crecimiento óptima y máxima, entre 26-28°C y 30-32°C, respectivamente (Kraus y col., 2004).

Otro aspecto destacable es la resistencia relativa de varias especies de *Trichoderma* a numerosos fungicidas químicos utilizados en agricultura, como los organoclorados de tipo endosulfano (Smith, 1995; Shaban y El-komy, 2001) y bencimidazoles (Mukherjee y col., 2003). Este hecho, junto con su velocidad de crecimiento y su fácil adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas, daría a *Trichoderma* ventaja sobre otros muchos hongos filamentosos, en

la colonización de suelos, cuando forman parte de formulados utilizados en el control de hongos fitopatógenos.

2. APLICACIONES DEL GÉNERO *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* poseen características que las convierten en organismos con un gran interés industrial. Por ejemplo, la habilidad de *T. reesei* para producir enzimas celulolíticas ha dirigido su explotación comercial hacia áreas tan diversas como las fermentaciones alcohólicas, los detergentes para el lavado de ropa, el blanqueo del papel reciclado, la alimentación animal o la producción de combustible (Rosgaard y col., 2007; Rahman y col., 2009).

Algunas especies de *Trichoderma* se usan en la biorremediación, liberando a los suelos de metales pesados como cadmio o níquel, o contaminantes ambientales como el hidrocarburo fenantreno (Hadibarata y col., 2007; Cao y col., 2008).

Además, ciertas especies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. gamsii*, *T. viride* o *T. virens*) son utilizadas en control biológico en agricultura. En algunos casos, en programas de manejo integrado, combinando agentes biológicos y químicos, para reducir la dosis de estos últimos hasta niveles subletales, gracias al efecto sinérgico de la acción de ambos tipos de tratamiento (Monte, 2001; Harman y col., 2004; Jiménez-Díaz y col., 2010).

Las especies de *Trichoderma* también pueden ser fuente de genes cuya aplicación biotecnológica esté dirigida hacia la obtención de plantas transgénicas con resistencia a enfermedades (Lorito y col., 1998) y a estreses abióticos (Dana y col., 2006; Montero-Barrientos y col., 2010).

Por otro lado, la capacidad de *Trichoderma* para secretar proteínas lo presenta como una alternativa a los organismos empleados hoy día como “fábricas celulares” para la producción de proteínas con fines farmacéuticos y se dispone de sistemas de transformación eficaces (Cardoza y col., 2006a).

3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

Hace casi 80 años que Weindling (1932) describió la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* (ahora *T. viride*) sobre el patógeno *Rhizoctonia solani*. Recientemente,

algunas cepas de *Trichoderma* han sido registradas en España y la Unión Europea como productos fitosanitarios para su aplicación en agricultura por su probada eficacia en el control biológico de hongos fitopatógenos, su gran capacidad para sobrevivir en distintos ambientes y su estabilidad genética y fenotípica (Jiménez-Díaz y col., 2010).

Los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol y en interacción con la planta son varios: (i) una especial habilidad para parasitar hongos fitopatógenos, debido a la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular: glucanasas, quitinasas y proteasas (Sanz y col., 2004); (ii) la competencia por espacio y nutrientes, especialmente en la rizosfera; (iii) la capacidad de promover el desarrollo de planta (Yedidia y col., 2001) y raíces (Contreras-Cornejo y col., 2009), así como, aumentar la captación de nutrientes y la eficacia fertilizante en la planta (Altomare y col., 1999), y la resistencia a estreses ambientales (Harman, 2000); (iv) la estimulación de las defensas de la planta frente a patógenos (Van Wees y col., 2008), y (v) la producción de antibióticos (Reino y col., 2008).

3.1. Micoparasitismo

Se define el micoparasitismo como la relación que un organismo establece con un hongo huésped de manera que se beneficia del mismo, normalmente obteniendo nutrientes, sin aportarle nada a cambio y, en ocasiones, causando su muerte. Cuando ocurre esto último se habla de micoparasitismo necrotrófico, para diferenciarlo del biotrófico, en el que se mantiene una relación con células vivas durante largos periodos de tiempo.

Los eventos que conllevan al micoparasitismo son complejos y tienen lugar de una manera secuencial (Figura 3). En primer lugar, *Trichoderma* localiza al patógeno y comienza a crecer por tropismo hacia él (Lu y col., 2004; Woo y col., 2006). Esta detección a distancia se debe, al menos parcialmente, a un gradiente químico generado por una secreción secuencial de enzimas que degradan la pared celular de los hongos (CWDEs). Aunque las diferentes cepas de *Trichoderma* pueden seguir distintos patrones de inducción de CWDEs, parece seguro que una exoquitinasa extracelular, producida de forma constitutiva a bajos niveles, podría estar implicada en este proceso. Esta exoquitinasa provoca la liberación de algunos oligómeros de la pared del hongo diana, induciendo la expresión de endoquitinasas del micoparásito (*Trichoderma*) (Brunner y col., 2003; Harman, 2006) que, al ser liberadas, difunden y hacen que *Trichoderma* comience el ataque al hongo diana antes de que se haya producido el contacto físico (Viterbo y col., 2002; Deng y col., 2007; Distefano y col., 2008).

Una vez que los hongos entran en contacto, *Trichoderma* puede enroscarse alrededor de su presa y formar estructuras especializadas de tipo apresorio, con las que podrá penetrar posteriormente en el interior de las hifas del patógeno. La unión parece estar mediada por la interacción entre carbohidratos (generalmente galactosa o fucosa) de la pared celular de

Trichoderma y lectinas del hongo diana (Inbar y Chet, 1996; Rocha-Ramírez y col., 2002; Reithner y col., 2005; Zeilinger y col., 2005). Una vez en contacto, *Trichoderma* produce varias CWDEs y antibióticos, que, como los peptaiboles (Schirmböck y col., 1994; Degenkolb y col., 2003), abren poros en la pared celular del hongo parasitado.

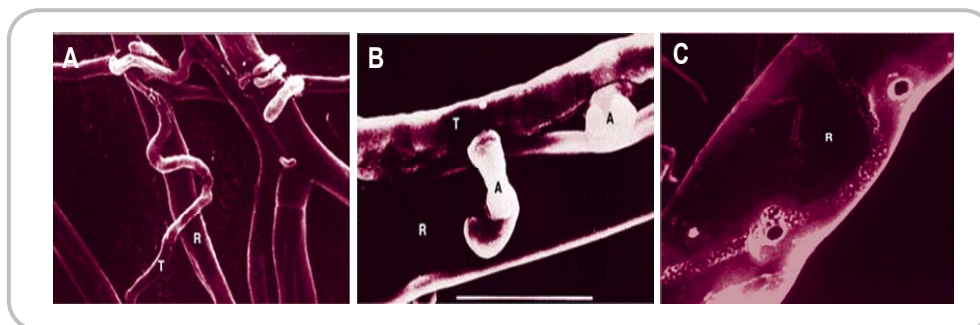


Figura 3. Micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* bajo el microscopio electrónico de barrido. Hifa de *Trichoderma* (T) enroscándose en una hifa de *R. solani* (R) (A). Apresorios que se forman en la interacción *Trichoderma*-*Rhizoctonia* (la barra equivale a 10 μ m) (B). Hifa de *R. solani* (de la que se ha retirado la hifa de *Trichoderma*) con los poros provocados por el micoparásito (C). Tomado de Harman y col. (2004).

Finalmente, *Trichoderma* entra al interior del micelio hospedador y digiere el contenido intracelular del hongo, fase que va acompañada de algunos cambios morfológicos como vacuolización, pérdida de citoplasma y desintegración de las hifas del hospedador (Benhamou y Chet, 1996). En algunos casos, también se observa la esporulación de *Trichoderma* tras la completa digestión del hongo atacado (Elad y col., 1984).

Entre los mecanismos de acción de *Trichoderma*, el micoparasitismo es el más conocido y estudiado. En los últimos 20 años se han purificado distintas CWDEs y clonado sus genes: proteasa PRB1 y PRA1 (Geremía y col., 1993; Suárez y col., 2004), quitinasas CHIT33, CHIT36, CHIT37, CHIT42 y CHIT72 (Ulloa y col., 1992; de la Cruz y col., 1992, Lorito y col., 1994a, Viterbo y col., 2002), α -glucanasas AGN13.1 (Ait-Lahsen y col., 2001) y AGN13.2 (Sanz y col., 2005), β -1,3 glucanasas BGN13.1 (de la Cruz y col., 1995a), β -1,6 glucanasas BGN16.2 y BGN16.3 (de la Cruz y col., 1995b, Montero y col., 2005 y 2007). Se ha realizado el aislamiento de los genes que codifican dichas enzimas (García y col., 1994; Hayes y col., 1994; Limón y col., 1995; Peterbauer y col., 1996), obtenido transformantes de *Trichoderma* (Migheli y col., 1998; Limón y col., 1999; Sanz y col., 2005; Montero-Barrientos y col., 2007) así como la regulación de los genes relativos al mismo (Lorito y col., 1996a; Mach y col., 1999). Además, se han obtenido plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y patata (*Solanum tuberosum*) que sobreexpresan la endochitinasa CHIT42 de *T. harzianum*, mostrando ser altamente tolerantes a patógenos foliares (*Alternaria alternata*, *A. solani*, y *Botrytis cinerea*) y patógenos de suelo (*R. solani*) (Lorito y col., 1998; Dana y col., 2006).

3.2. Competencia por distintos recursos

La competencia es un aspecto importante del control biológico y ocurre cuando dos o más microorganismos requieren un mismo recurso (nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz, etc.) en mayor medida de lo que está disponible de forma inmediata. La ubicuidad de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo es una prueba de que es un buen competidor por el espacio y por los recursos nutritivos (Benítez y col., 2004; Hermosa y col., 2004). *Trichoderma* se encuentra en casi todos los suelos y también en hábitat naturales que contienen grandes cantidades de materia orgánica, donde se comporta como un excelente descomponedor de material vegetal y fúngico. Además, muchas especies del género *Trichoderma* muestran una gran versatilidad metabólica que les permite crecer utilizando un amplio abanico de fuentes de nitrógeno y carbono (Grondona y col., 1997). Por otra parte, la capacidad para colonizar la rizosfera de las plantas es un punto clave en el proceso ya que un agente de control biológico que no sea capaz de crecer en la rizosfera no podrá competir por el espacio y los nutrientes de ese ecosistema (Howel, 2003; Benítez y col., 2004). Por ejemplo, la competición de *T. harzianum* por el espacio físico es un mecanismo particularmente importante para el biocontrol de fitopatógenos como *B. cinerea*, causante de la “podredumbre gris” en racimos de uvas (Dubos y col., 1982). En la bibliografía se pueden encontrar otros casos en los que se alude a la competencia por los nutrientes como responsable directo del efecto antagonista de *Trichoderma* (Howell y Stipanovic, 1995; Handelsman y Stabb, 1996; Lo y col., 1996). En la Figura 4 se muestra un cultivo dual de *Trichoderma* y el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*.

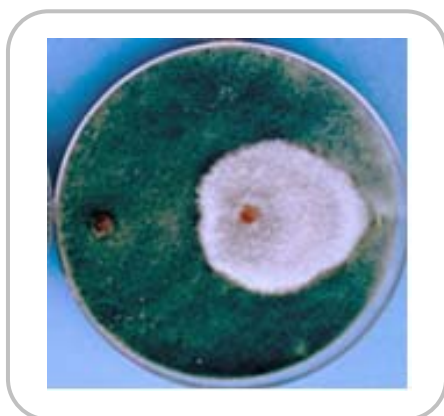


Figura 4. Cultivo dual de *T. harzianum* (izquierda) y el hongo patógeno de fresa *Colletotrichum acutatum* (derecha).

A pesar de todo, es difícil determinar si sólo a través de la competencia *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción antagonista o si, por el contrario, otros mecanismos como el micoparasitismo o la antibiosis preparan el escenario para que la competencia se lleve a cabo de una forma más eficaz (Harman, 2006).

3.3. Promoción del crecimiento de las plantas

En los últimos años se ha comprobado la capacidad de ciertas cepas de *Trichoderma* (Ej. *T. harzianum* y *T. virens*) para estimular el crecimiento y el desarrollo de las raíces de las plantas, lo que se traduce en un incremento de la productividad (Harman y col., 2004). Para explicar este hecho se han sugerido varios mecanismos como son: la producción de factores de crecimiento y vitaminas, el control de patógenos menores o la conversión de material no utilizable (metales como zinc, manganeso, hierro, cobre) en formas que puedan ser asimiladas por las plantas (Altomare y col., 1999).

Otras propiedades identificadas en *Trichoderma* a lo largo del proceso de interacción con la planta, son la resistencia a diferentes tipos de estrés abióticos y cambios en el estado nutricional (Howel, 2003). Estudios recientes demuestran que algunas cepas de *Trichoderma* pueden regular los niveles de auxina en la rizosfera (Contreras-Cornejo y col., 2009) y estimular el crecimiento de las plantas (Chang y col., 1986; Yedidia y col., 2001), además de proteger el sistema radical e inducir la defensa sistémica frente al ataque de patógenos.

Sin embargo, no todas las especies de *Trichoderma* pueden estimular el crecimiento y las defensas de la planta. El grupo BREVICOMPACTUM engloba especies que producen metabolitos secundarios, como *harzianum* A o *trichodermina*, y se sitúan filogenéticamente alejadas de los linajes que agrupan a las especies de biocontrol. De hecho, se ha documentado que sustancias como *harzianum* A y *trichodermina* son fuertes inhibidores de la germinación de semillas y no promueven el crecimiento de las plantas por ser sustancias fitotóxicas (Cutler y LeFiles, 1978; Nielsen y col., 2005; Degenkolb y col., 2008a).

3.4. Inducción de mecanismos de defensa de las plantas

La capacidad de distintas cepas de *Trichoderma* para proteger a la planta frente a patógenos de raíz se atribuyó, durante mucho tiempo, a un efecto directo contra el patógeno (Chet y col., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que la asociación directa de *Trichoderma* con las raíces de la planta, estimula los mecanismos de defensa de la misma (Bailey y col., 1993; Yedidia y col., 1999; Korolev y col., 2008; Segarra y col., 2009), lo que conlleva a una resistencia contra varios tipos de microorganismos fitopatógenos e incluso nemátodos (Harman y col., 2004). Esta resistencia inducida no es específica de un determinado tipo de planta y puede ser localizada o sistémica, capacitándola para ejercer una respuesta mayor y más rápida ante el ataque de patógenos (Conrath y col., 2002). Esta respuesta incluye la secreción de peroxidasas, la síntesis de fitoalexinas (Howell y col., 2000), la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis o “PRs” (proteínas producidas por la planta como respuesta a patógenos y heridas), la biosíntesis de compuestos terpénicos (Howell y col.,

2000 y 2006) o el aumento de los niveles de ácido salicílico y ácido jasmónico (Shoresh y col., 2005; Segarra y col., 2007).

3.5. Antibiosis

La antibiosis consiste en la inhibición del crecimiento de un organismo por el producto metabólico de otro, sin que medie contacto físico entre ellos. Muchas cepas de *Trichoderma* liberan metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles (Cardoza y col., 2005; Reino y col., 2008), que producen este efecto, además de actuar como moléculas señalizadoras en el diálogo con la planta (Vinale y col.; 2006). La actividad antibiótica de *Trichoderma* fue detectada por primera vez por Weindling (1932) y desde entonces se han descrito numerosos antibióticos producidos por las especies de este género.

La producción de los metabolitos secundarios, compuestos que parecen no tener un papel esencial en el metabolismo de los organismos que los producen, es dependiente de la cepa y de las condiciones ambientales, que determinan qué compuestos se sintetizarán y en qué cantidad (Cardoza y col., 2005). Por otra parte, el papel de estos compuestos en el antagonismo es fundamental, y los mecanismos de antagonismo que *Trichoderma* utiliza no son independientes, sino que interactúan unos con otros (Jeger y col., 2009). Un ejemplo de este sinergismo se ha observado en el efecto antifúngico frente a varios hongos fitopatógenos de los géneros *Botrytis*, *Fusarium* o *Alternaria*, que se incrementa tras una aplicación conjunta de antibióticos y CWDEs de *Trichoderma* (Schirmböck y col., 1994; Lorito y col., 1996b).

4. METABOLITOS SECUNDARIOS DE *TRICHODERMA*

Durante años los metabolitos secundarios fueron sólo materia de interés para los químicos orgánicos que se ocupaban principalmente de su aislamiento, identificación y síntesis, pero no de aspectos como el metabolismo del hongo o sus interacciones ecológicas (Cardoza y col., 2005).

Los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* se clasifican en diferentes grupos según su origen biosintético y su estructura química. Por lo general, una cepa tiene la capacidad de producir varios metabolitos, algo que dificulta poder relacionar una determinada ruta biosintética con su capacidad de biocontrol.

De manera general, en base a las estructuras identificadas hasta ahora de los diferentes metabolitos que exhiben actividad antibiótica en *Trichoderma*, se pueden distinguir dos grupos principales:

- I. *Metabolitos de bajo peso molecular (< 3000 Da) y volátiles*: incluyen compuestos aromáticos sencillos, algunos poliquétidos como pironas y butenólidos, terpenos volátiles y de tipo isociano, y sustancias relativamente no polares que tienen una presión de vapor significativa. En el ambiente del suelo, estos compuestos orgánicos volátiles (VOCs) podrían recorrer distancias a través del sistema edáfico y la rizosfera, y mejorar la condición de un organismo al modificar la fisiología de otros organismos competidores, como sucede con la 6-pentil- α -pirona (6PP) (Keszler y col., 2000; Vinale y col., 2008; Daoubi y col., 2009).
- II. *Metabolitos de alto peso molecular y polares*: incluye peptaiboles que pueden exhibir su actividad en interacción directa por contacto entre especies de *Trichoderma* y sus antagonistas (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Szekeres y col., 2005).

Entre los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana más representativos del género *Trichoderma* están los peptaiboles, los poliquétidos y los terpenos (Cardoza y col., 2005; Reino y col., 2008). Recientemente, el desarrollo de la genómica y la proteómica ha permitido identificar algunos genes de sus rutas biosintéticas. Sin embargo, a pesar de la importancia toxicológica y biotecnológica y de sus características antibióticas y citotóxicas, la biología de estos metabolitos está poco estudiada en *Trichoderma*.

4.1. Peptaiboles

Son una gran familia de péptidos lineales (7-20 aminoácidos) naturales sintetizados por muchos hongos, entre los que *Trichoderma* destaca como productor. Son sintetizados por péptido sintetasa no ribosómicas (NRPSs), las enzimas encargadas de la ejecución, modificación y condensación de los aminoácidos que componen la molécula final (Wiest y col., 2002; Varga y col., 2005; Stack y col., 2007).

Los peptaiboles se caracterizan por tener un alto contenido del aminoácido α,α -ácido dimetilisobutírico (Aib), un aminoalcohol C-terminal, como fenilalaninol o leucinol, y un grupo N-terminal acilado, usualmente acetilado. En la naturaleza se encuentran como mezclas de isoformas y se conocen más de 300 secuencias aminoacídicas diferentes (Wiest y col., 2002).

Estos compuestos se dividen en tres subgrupos: (i) peptaiboles de cadenas largas que contienen entre 18-20 residuos de aminoácidos como las alameticinas (Mohr y Kleinkauf, 1978), aisladas de una cepa entonces clasificada como *T. viride*, o las trichorzianinas de *T. harzianum* (Wiest y col., 2002; Vizcaino y col., 2006a); (ii) peptaiboles de cadena corta (Jaworki y col., 1999), con 11-16 residuos, como las trichovirinas, igualmente purificadas de una cepa identificada por métodos clásicos como *T. viride*, la harzianina A y las trichorozinas de *T. harzianum*, o la trikoningina B de *T. koningii* (Huang y col., 1995; Song y col., 2007); y (iii) lipopeptaiboles, con 7-11 residuos, con el N-terminal acilado por una cadena corta de ácidos

grasos, siendo ácido octanoico en la trichogina A de *T. longibrachiatum* y la trichodecenina de *T. viride* (Fujita y col., 1994). Las trichopolinas de *T. polysporum*, son el único grupo de peptaiboles que se caracteriza por presentar el N-terminal esterificado con un grupo R-2-metildecanoil, un residuo 2-amino-6-hidroxi-4-metil-8-ácido oxodecanoico en la posición 2 y un grupo C-terminal inusual (Fujita y col., 1981; Reino y col., 2008).

En líneas generales, los peptaiboles presentan actividad antibiótica contra bacterias Gram positivas y hongos (Jen y col., 1987). Su actividad antibacteriana se debe a la capacidad para modificar la membrana y formar canales dependientes de voltaje transmembrana (Sansom, 1991; Chugh y Wallace, 2001). Por otro lado, los peptaiboles actúan en la membrana del hongo diana inhibiendo enzimas asociadas a ésta, las cuales se encuentran involucradas en la síntesis de pared. Además, se ha demostrado que los peptaiboles actúan sinérgicamente con las CWDE en la inhibición de hongos fitopatógenos (Schirmböck y col., 1994; Lorito y col., 1996b).

4.2. Poliquétidos

Son un grupo de metabolitos secundarios que exhiben una gran diversidad, tanto en estructura como en función (Figura 5). Los poliquétidos tienen importancia farmacológica por su actividad antimicrobiana, antifúngica, antiparasitaria o antitumoral. Se han descrito en bacterias, hongos, plantas, insectos, dinoflagelados, moluscos e incluso esponjas (Cardoza y col., 2005).

Los poliquétidos son sintetizados en una secuencia de reacciones catalizadas por las poliquétido sintasas (PKSs), grandes complejos multienzimáticos que contienen un grupo coordinado de sitios activos. La biosíntesis ocurre de forma gradual desde el carbono 2, 3 ó 4 y se van construyendo bloques de acetil-CoA, propionil-CoA, butiril-CoA y sus derivados activados, malonil-, metilmalonil- y etilmalonil-CoA (Hutchinson y col., 2000).

En muchos compuestos aislados de *Trichoderma* que poseen este tipo de estructura, se han observado propiedades antifúngicas. Por ejemplo, compuestos heterocíclicos del oxígeno como la harzianopiridona, la harzianolida y la dehidroharzianolida, aislados de *T. harzianum*, y compuestos volátiles octaquétidos (pironas) como la 6PP, inicialmente aislada de *T. viride*, se observó que inhibían el crecimiento de *R. solani* (Dickinson, 1993; Kennedy y col., 1999). También, la 6-pentil-1-enil- α -pirona, un dehidroderivado de 6PP, aislado de *T. harzianum*, mostró inhibición del crecimiento de *R. solani*, *Fusarium oxysporum* y *B. cinerea* (Rubio y col., 2009), y las konigininas aisladas de *T. koningii*, *T. harzianum* y *T. aureoviride*, inhibieron a *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Cooney y Lauren, 1999).

4.3. Terpenos

Son los metabolitos secundarios más abundantes y mayoritariamente distribuidos en la naturaleza. Poseen una variedad de funciones antagónicas en la interacción beneficiosa entre organismos. Sin embargo, como la mayoría de los productos naturales, los terpenos generalmente se producen en pequeñas cantidades y en mezclas complejas (Gershenzon y Dudareva, 2007).

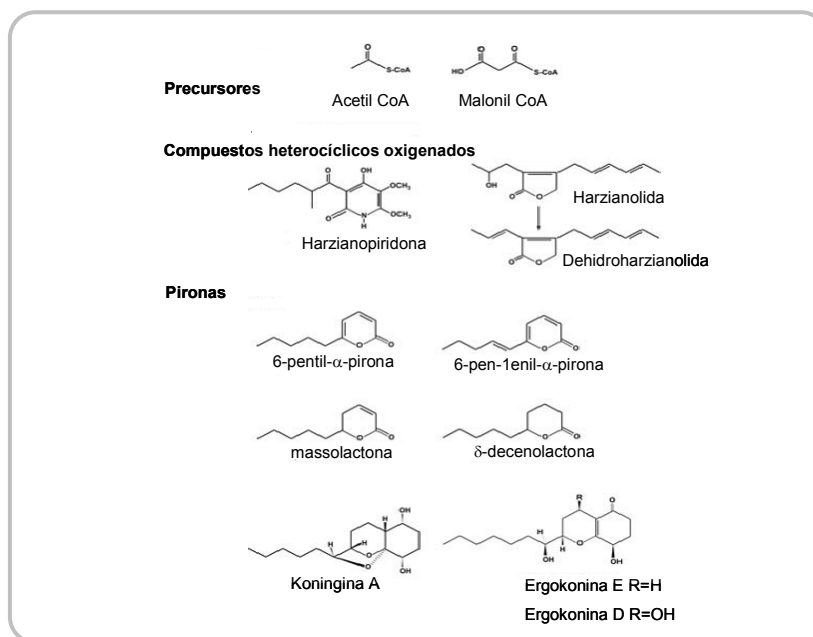


Figura 5. Estructura de los precursores de la biosíntesis de poliquétidos y las estructuras poliquetídicas más representativas de compuestos producidos por *Trichoderma* con actividad antifúngica. Tomado de Cardoza y col. (2005).

La mayoría de los terpenos no son volátiles, sirviendo como señales para la comunicación con la planta y la interacción planta-planta (Heil y Silva Bueno, 2007; Dudareva y Pichersky, 2008). Además, los terpenos poseen otras actividades biológicas: antibacteriana, antifúngica, antivírica, antiparasitaria, antitumoral y antiinflamatoria (Savoia y col., 2004; Trombetta y col., 2005; Chinworrungsee y col., 2008). También, se ha descrito que los terpenos como el ácido abscísico (ABA) de plantas confieren resistencia contra insectos herbívoros y patógenos, además de estar implicados en la germinación de semillas, el crecimiento de las mismas y la sensibilidad a otras hormonas vegetales como el etileno y el ácido jasmónico. ABA también juega un papel importante en la adaptación a los estreses ambientales, tales como sequía, salinidad y frío (Asselbergh y col., 2008; Cutler y col., 2010).

A diferencia de los peptaiboles y los poliquétidos, que son sintetizados por grandes proteínas moduladoras con subdominios enzimáticos, en la biosíntesis de los terpenos están

implicadas proteínas individuales que participan en los diferentes pasos de la ruta. Al día de hoy, para las especies *Fusarium graminearum* y *F. sporotrichioides*, se ha descrito la ruta de biosíntesis de terpenos y varios genes reguladores de la misma (Brown y col., 2004; Kimura y col., 2003 y 2007). En *T. harzianum* se han aislado los genes que codifican las enzimas de algunas de estas etapas como el *erg1*, involucrado en el paso de escualeno a oxidoescualeno, y el *erg7*, en el paso de oxidoescualeno a lanosterol (Cardoza y col., 2006b). Además de la clonación y caracterización del gen *hmgR*, que codifica la hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMGR), llave enzimática en la biosíntesis de terpenos (Cardoza y col., 2007).

4.3.1. Biosíntesis de compuestos terpénicos

En general y a pesar de la gran diversidad en forma y función, los terpenos de plantas y microorganismos tienen un origen biosintético común. Derivan de la construcción de unidades comunes de cinco carbonos sobre la base de un esqueleto isopentil difosfato (IPP), producido por las rutas del ácido mevalonónico (MVA) y del metileritriol fosfato (MEP) (Daum y col., 2009).

La biosíntesis de los terpenos puede dividirse en cuatro etapas generales: (i) síntesis del precursor isopentil difosfato (IPP), (ii) adiciones repetitivas de IPP para formar una serie de homólogos prenil difosfato, los cuales sirven como un precursor inmediato de las distintas clases de terpenos, (iii) elaboración de estos prenil difosfatos por terpeno sintetasas específicas para producir esqueletos terpenoides, y (iv) modificaciones enzimáticas secundarias del esqueleto (en su mayoría reacciones redox) para dar lugar a los diferentes productos naturales con diferentes propiedades funcionales (Dudareva y col., 2004).

i) Síntesis del precursor isopentil difosfato (IPP)

Existen dos rutas fundamentales para la síntesis del isopentil difosfato (IPP): MVA y MEP. La ruta MVA, localizada en el citosol, y común en la biosíntesis de sesquiterpenos en eucariotas (Figura 6) incluye dos pasos de condensación de tres moléculas de acetil-coenzima A (CoA) catalizados por una tiolasa y una hidroximetilglutaril CoA sintasa. El producto resultante, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), es subsecuentemente reducido por la HMG-CoA reductasa, enzima codificada por el gen *hmgR* (Cardoza y col., 2007), en dos reacciones acopladas que forman MVA. Dos fosforilaciones secuenciales, dependientes de ATP y llevadas a cabo por kinasas del MVA y MVAP, forman el MVA 5-difosfato, y una posterior fosforilación/descarboxilación por una MVAPP descarboxilasa lleva al isopentil difosfato (IPP) (Daum y col., 2009). Una ruta alternativa para la biosíntesis del IPP es la ruta 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), también conocida como la vía del 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) y que es utilizada por plantas, bacterias y algas verdes. Esta ruta comienza a partir de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002), y está implicada en la biosíntesis de hemiterpenos, monoterpenos y diterpenos (Daum y col., 2009).

En el caso de los hongos, se acepta que los terpenos deriven de la ruta MVA pero se ha descrito una interconexión entre ambas rutas (Laule y col., 2003; Schuhr y col., 2003).

ii) Adición repetitiva de IPP para formar homólogos prenil difosfato

IPP es utilizado en una secuencia de reacciones de elongación para producir una serie de homólogos prenil difosfato, los cuales sirven como precursores intermediarios de las diferentes familias de terpenos.

La isomerización de IPP produce el isómero alélico dimetilalil difosfato (DMAPP), que es el primer prenil difosfato (Figura 6). El IPP y el DMAPP se combinan para formar el monoterpeno (con 10 átomos de carbonos) geranil difosfato (GPP), precursor de otros monoterpenos. Adiciones secuenciales de unidades de IPP, catalizada por pequeñas cadenas de preniltransferasas (Liang y col., 2002), generan el farnesil difosfato (FPP) (15 carbonos) que es precursor común de sesquiterpenos como el farnesol, del grupo hemo de los citocromos, de compuestos isoprenoides, esterol, ubiquinona y dolicol (Grünler y col., 1994, Ogura y col., 1997; Attucci y col., 1995; Shirliff y col., 2009), y el geranilgeranil difosfato (20 carbonos) (GGPP) que, a su vez, es precursor de diterpenos (Dudareva y col., 2004).

iii) Conversión del prenil difosfato por terpeno sintetasas específicas en la producción de esqueletos terpénicos

Esta etapa implica la conversión de los diferentes prenil difosfatos, DMAPP, GPP, FPP y GGPP, a hemiterpenos (isopreno y 2-metil-3-buten-2-ol), monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos y diterpenos, respectivamente (Dudareva y col., 2004). Estas reacciones son catalizadas por una gran familia de enzimas conocida como las terpeno sintasas (Cane, 1996), enzimas responsables de formar múltiples productos a partir de un solo sustrato (Keeling y col., 2008).

También es posible la dimerización de FPP, por la enzima escualeno sintasa, para formar escualeno (un triterpeno), y su ciclación por escualeno epoxidasa, produciendo lanosterol y ergosterol (Bao y col., 2004), saponinas, ceras cuticulares y otros compuestos de defensa de las plantas (Rasbery y col., 2007).

Una familia particular de sesquiterpenos no volátiles la constituyen los trichotecenos producidos por hongos, que poseen una alta actividad antibiótica e inducen apoptosis en células animales, aunque el conocimiento sobre cómo interactúan con las plantas es hasta ahora limitado (Rocha y col., 2005). Debido a que los trichotecenos son activos en el sitio peptidil transferasa de la subunidad ribosómica 60S en células eucariotas y, consecuentemente bloquean la traducción en los ribosomas eucariotas (McLaughlin y col., 1977), se cree que

éstos son un factor de virulencia durante la infección de la planta por el hongo que produce el trichoteceno (Proctor y col., 1995a; Bai y col., 2002). Por tanto, en general se piensa que los trichotecenos suprimen las respuestas de defensa en la planta (Masuda y col., 2007). Sin embargo, a determinadas concentraciones los trichotecenos como la toxina T2 producida por *F. graminearum*, tienen actividad tipo elicitora, incluyendo la activación de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), la inducción de genes de defensa, acumulación de ácido salicílico, especies reactivas de oxígeno y formación de lesiones en la planta (Nishiuchi y col., 2006).

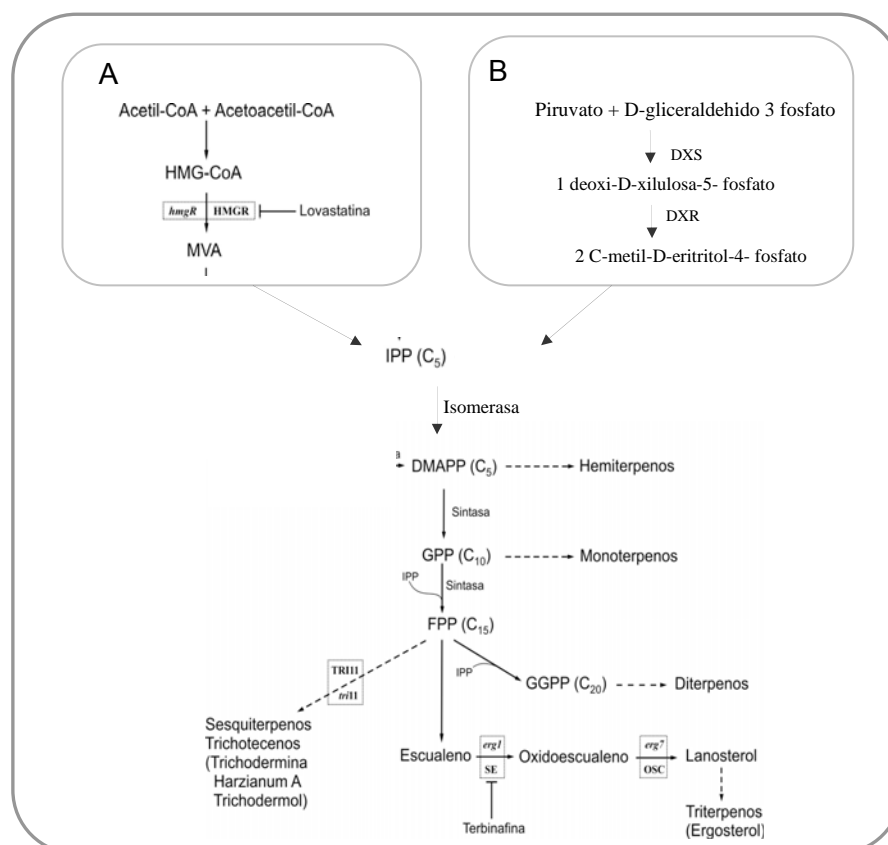


Figura 6. Ruta biosintética de terpenos acíclicos. Ruta del ácido mevalónico (MVA) (A), Ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (B). Las flechas punteadas muestran posibles rutas de síntesis de diferentes clases de terpenos en *Trichoderma*. Abreviaturas: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA); 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR); 1-Deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS); 1-Deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductasa (DXR); isopentil difosfato (IPP); dimetilalil difosfato (DMAPP); geranil difosfato (GPP); farnesil difosfato (FPP); geranilgeranil difosfato (GGPP); escualeno epoxidasa (SE); oxidoscualeno ciclasa (OSC). Imagen compuesta a partir de Cardoza y col. (2007) y Daum y col. (2009).

iv) Modificaciones enzimáticas secundarias del esqueleto de carbono para dar los diferentes productos naturales

Muchos terpenos volátiles son producidos directamente por acción de terpeno sintasas, pero otros son formados por transformaciones catalizadas por proteínas relacionadas con éstas

enzimas (Dudareva y col., 2004) como las oxidaciones llevadas a cabo por citocromos P450 (Kirby y Keasling, 2009) y deshidrogenasas, las acilaciones y metilaciones de los grupos hidroxilo y carboxilo, las eliminaciones de grupos carboxilo, las adiciones de grupos hidroxilo, o la formación de ésteres y éteres (Cardoza y col., 2007; Daum y col., 2009).

4.3.2. Tipos de compuestos terpénicos

i) Hemiterpenos, monoterpenos y diterpenos

Los hemiterpenos son los terpenos más pequeños, con una sola unidad de isopreno (cinco carbonos). El hemiterpeno más conocido es el propio isopreno, un producto volátil que se desprende de los tejidos fotosintéticamente activos. Además, los derivados que contienen oxígeno tales como el prenol y el ácido isovalérico son hemiterpenoides.

Los monoterpenos como el linalol, mentol, alcanfor o geraniol aislados de plantas (Masumoto y col., 2010) son compuestos relativamente volátiles, generados a partir del GPP. Se caracterizan por poseer un esqueleto carbonado compuesto por dos unidades isopreno ($C_{10}H_{16}$) (McGarvey y Croceteau, 1995). Este tipo de compuestos no han sido aislados individualmente en *Trichoderma* (Zeppa y col., 1990). Los monoterpenos se utilizan en productos de perfumería y saborizantes de alimentos o medicamentos, y muy pocos como el perill alcohol (POH), conservan actividad antibacteriana o antitumoral (Chung y col., 2006).

Los diterpenos, procedentes biosintéticamente del GGPP, constituyen un grupo muy amplio de componentes de las plantas, cuya característica común es la de poseer una estructura básica compuesta por cuatro unidades isopreno ($C_{20}H_{32}$). Dentro de este grupo se encuentra el taxol, también conocido como paclitaxel, compuesto obtenido a partir de las cortezas de tejo americano (*Taxus brevifolia* Nutt.) que ha mostrado una elevada eficacia en el tratamiento de algunos tipos de cánceres. Este compuesto es un diterpeno tricíclico con una función amida por lo que en ocasiones se considera como un pseudoalcaloide (Manfredi y col., 1982; Boussen y col., 2010). El único representante de los diterpenos del género *Trichoderma* es la harzianodiona, aislada de *T. harzianum* (Ghisalberti y col., 1992).

ii) Triterpenos y esteroides

En hongos y animales, el primer triterpeno tetracíclico detectado en la ruta de escualeno a esteroides fue el lanosterol, y en algas y plantas fue el cicloartenol. La formación de lanosterol se inicia con la acción de la escualeno epoxidasa que lleva a cabo una epoxidación estereo específica del escualeno a 2,3 (S)-oxidoescualeno. La oxidoescualeno-lanosterol ciclase cataliza la conversión de oxidoescualeno a lanosterol, paso clave en la biosíntesis de esteroides (Cardoza y col., 2005).

La producción de esterol en *Trichoderma* fue detectado por primera vez por Kamal y col. (1971) en la fermentación de *T. pseudokoningii*, obteniéndose lanosterol, ergosterol y pirocalciferol. El ergosterol también se aisló de *T. hamantum* (Hussain y col. 1975) y posteriormente se han aislado las ergokoninas A y B de *T. koningii* (Reichenbach y col. 1990; Augustiniak y col., 1991) y la ergokonina A de *T. viride*. (Kumeda y col. 1994) y *T. longibrachiatum* (Vicente y col. 2001). Las ergokoninas A y B de *Trichoderma* son ejemplos de antibióticos esteroideos con actividad frente a especies de *Candida* y *Aspergillus* (Peláez y col., 2000; Vicente y col., 2001). Además, la ergokonina A induce alteraciones en la morfología de las hifas de *A. fumigatus* e inhibe la 1,3-β-D-glucano sintasa (Onishi y col., 2000).

iii) Sesquiterpenos

La biosíntesis de sesquiterpenos está controlada por las enzimas sesquiterpeno sintasas, responsables de la formación de más de 200 compuestos diferentes. Cada sintasa puede convertir el precursor FPP en un sesquiterpeno diferente, a través de un mecanismo común de ionización del éster difosfato alélico, seguido por una secuencia precisa de adiciones de reacciones electrofílicas intramoleculares. Una de las funciones de estas sintasas es la de imponer una conformación plegable particular en el precursor acíclico FPP o su equivalente nerolidil difosfato (Cane y col., 1996).

Algunos sesquiterpenos como la toxina T2 de *Fusarium* causan una variedad de micotoxicosis en animales y humanos, debido principalmente a que este tipo de toxinas inhibe la síntesis de proteínas. Además, la toxina T2 es de interés agropecuario debido a que puede acumularse a niveles significativos en los cultivos de cereales infectados con *Fusarium* (Brown y col., 2004).

Los sesquiterpenos de *Trichoderma* han demostrado actividad antibacteriana, antifúngica y neuroléptica (Bennett y Klich, 2003; Berg y col., 2004). Un ejemplo de sesquiterpeno con actividad antifúngica es el 3,4-dihidroxicaroteno, aislado de *T. virens* y *T. viride*. También se ha aislado de *T. viride* un sesquiterpeno llamado lignoreno, que muestra moderada actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Pseudomonas aeruginosa* y frente a hongos como *Sporobolomyces salmonicolor* y *Rhodotorula rubra* (Berg y col., 2004).

Un tipo particular de sesquiterpenos son los trichotecenos, los cuales constituyen una familia de más de 60 metabolitos sesquiterpeno epóxidos producidos por diferentes géneros de hongos como *Trichoderma*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys* o *Trichothecium* (Grove y col., 1988). El término trichoteceno deriva de la trichotecina, uno de los primeros miembros identificados en esta familia. Todos los trichotecenos contienen un esqueleto común o anillo tricíclico llamado trichoteceno que usualmente contiene un epóxido entre los carbonos 12 y 13, y un número variable de grupos hidroxilo o acetoxilo (Desjardins y col., 1993; Reino y

col., 2008) (Figura 7). Los trichotecenos están divididos en cuatro grupos según su estructura química y a su vez poseen diferentes radicales: i) Tipo A: es el grupo más grande, contienen un radical con enlace sencillo en el carbono 8 (C-8) (trichodermina, neosolaniol, toxina T2, toxina HT-2), ii) Tipo B: es el grupo más extendido, tienen un grupo cetónico en C-8 (nivalenol, deoxinivalenol, trichotecina), iii) Tipo C: tiene un segundo anillo epóxido entre C-7 y C-8 o C-9 y C-10 (crotocina), iv) Tipo D: contiene un anillo macrocíclico entre el C-4 y C-15 con dos uniones tipo ester (verrucarina A, roridina E y harzianum A, pudiendo este último no contener el anillo macrocíclico entre el C-4 y C-15) (Grove, 2007; Kimura y col., 2007; Reino y col., 2008).

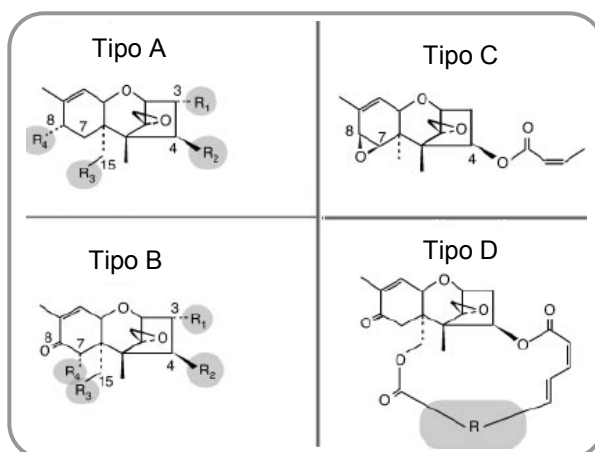


Figura 7. Tipos de estructuras químicas de los trichotecenos. En el esqueleto de los trichotecenos existen cinco posiciones donde se pueden agregar grupos funcionales (C-3, C-4, C-15, C-7 y C-8). Tipo A: ej. toxina T2. Tipo B: ej. nivalenol. Tipo C: ej. crotocina. Tipo D: ej. harzianum A con enlace éster en C15. Modificado de Kimura y col. (2007).

En eucariotas, muchas de las propiedades tóxicas de los trichotecenos se atribuyen a su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas. Inicialmente, se observó con la trichodermina, un trichoteceno aislado en 1964 de una cepa de *T. viride* (recientemente reidentificada como *T. brevicompactum*) que inhibía la actividad de una peptidil transferasa (Godtfredsen y Vangedal, 1965; Carrasco y col., 1973; Gilly y col., 1985). Ese mismo efecto inhibitor fue también observado para la toxina T2 (Stafford y McLaughlin, 1973; Wei y col., 1974).

Aunque todos los trichotecenos, cuyo mecanismo de acción se ha descrito hasta ahora, inhiben la peptidil transferasa por unión en el mismo sitio del ribosoma, la variación observada en los efectos de las distintas moléculas se debe a los diferentes radicales. Así, el anillo epóxido entre C-12 y C-13 es esencial para la inhibición de la síntesis de proteínas y contribuye a la toxicidad (Reino y col., 2008). Además, muchos de estos compuestos tienen un doble puente entre C-9 y C-10 (Reino y col., 2008), como por ejemplo el acetil deoxinivalenol (Garo y col., 2003), el nivalenol, la toxina HT-2 y la toxina T2, siendo estas variaciones importantes en la actividad tóxica de estos compuestos (Ghisalberti y Rowland, 1993).

Se ha demostrado que ciertos trichotecenos como trichotecinol A, aislado de *T. roseum* (Konishi y col., 2003), o harzianum A, producido por *T. arundinaceum* (Lee y col., 2005), poseen actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares de eucariotas por inducción de apoptosis (Gallo y col., 2004; Rocha y col., 2005). También actúan como inmunosupresores (Rotter y col., 1996) y neurotoxinas (Martín y col., 1986), y se ha demostrado su participación en micotoxicosis de animales de granja (Grove, 1988), y su fitotoxicidad, ya que contribuyen a la virulencia de algunos fitopatógenos como *Fusarium* durante la infección de la planta (Proctor y col., 1995a).

Compuestos como la trichodermina, aislada de *T. polysporum*, *T. sporulosum* y *T. brevicompactum* y el harzianum A, aislado de cepas de *T. arundinaceum* son ejemplos de trichotecenos con actividad antifúngica (Corley y col., 1994; Degenkolf y col., 2008a).

4.3.3. Regulación de la biosíntesis de trichotecenos

La biosíntesis de los trichotecenos está regulada a nivel transcripcional por factores genéticos y ambientales (Hohn y col., 1993). Se ha propuesto un modelo genético, con varios genes denominados “*tri*”, que se agrupan en regiones genómicas, para explicar la regulación de la ruta biosintética de los trichotecenos en especies de *Fusarium* como *F. graminearum* y *F. sporotrichioides* (Brown y col., 2003) (Figura 8). En *T. arundinaceum* se ha aislado el gen *tri5*, requerido en la biosíntesis de los trichotecenos. Además, parece que este gen también se encuentra en otras especies como *T. harzianum*, *T. viride* y *T. atroviride* (Gallo y col., 2004).

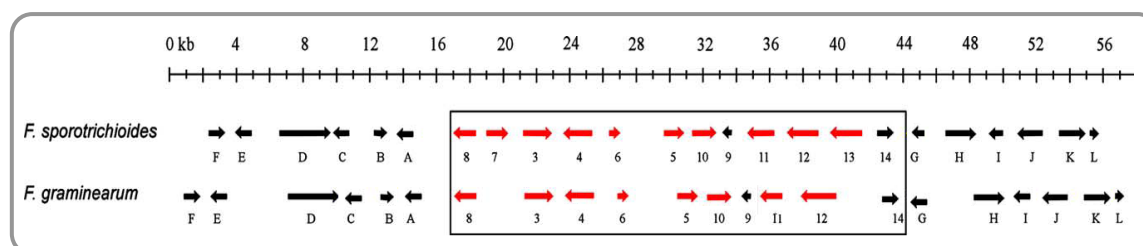


Figura 8. Organización del grupo de genes *tri* en *Fusarium sporotrichioides* y *F. graminearum*. El recuadro negro enmarca el conjunto de genes *tri* implicados en la biosíntesis de trichotecenos de *F. sporotrichioides* y *F. graminearum*. Cada flecha representa un gen, y su dirección indica el sentido de su transcripción. Los números debajo de cada flecha indica la designación de cada gen *tri*, (ej. 5 indica *tri5*). Las letras A-L están indicando ORFs identificados fuera del grupo de genes *tri*. En rojo: genes con función conocida en la biosíntesis de trichotecenos de *Fusarium*; en negro: genes con función desconocida en la biosíntesis de trichotecenos. Modificado de Brown y col. (2004).

Doce genes *tri* se encuentran localizados formando un *cluster*, una región de 25 y 26 kb en los genomas de *F. graminearum* y *F. sporotrichioides*, respectivamente (Tag y col., 2001; Brown y col., 2002) (Figura 8). Dicha región está altamente conservada en ambas especies (Kimura y col., 2007) y está acotada por *tri14*, un gen no necesario para la síntesis de

trichotecenos pero implicado en la virulencia y la producción de toxinas durante la patogénesis en tejidos de plantas (Dyer y col., 2005; Kimura y col., 2007), y *tri8*, que codifica una trichoteceno C-3 deacetilasa con identidad de secuencia con lipasas fúngicas (Brown y col., 2004).

Entre los genes localizados en el *cluster*, *tri4*, *tri5*, *tri6* y *tri10*, codifican factores clave para la ruta biosintética de los trichotecenos. El gen *tri5* (antiguamente *tox5* en *Fusarium*), localizado en el centro del *cluster*, está presente como copia única y aparece altamente conservado entre las especies de *Fusarium*, codifica la trichodieno sintasa, un enzima clave de la ruta de trichotecenos que cataliza la ciclación e isomerización del FPP a trichodieno (TDN) (Hohn y Beremand, 1989; Desjardins y col., 1993; Proctor y col., 1995a; Tag y col., 2001).

El gen *tri5* se clonó por primera vez en *F. sporotrichioides* (Hohn y Beremand, 1989) y, posteriormente, se aisló de *F. sambucinum* (teleomorfo: *Gibberella pulicaris*) (Hohn y Desjardins, 1992), *F. graminearum* (teleomorfo: *Gibberella zeae*) (Proctor y col., 1995a) y *F. poae* (Fekete y col., 1997). También, se ha publicado la presencia de este gen en *F. lunulosporum*, *F. cerealis*, *F. culmorum* y *F. pseudograminearum* (Ward y col., 2002), *Stachybotrys chartarum* (Koster y col., 2009) y *Myrothecium roridum* (Trapp y col., 1998).

Por otro lado, *tri4* codifica una citocromo P450 monooxigenasa multifuncional, implicada en cuatro pasos secuenciales de oxigenación y responsable de la conversión de TDN en isotrichotriol (Desjardins y col., 1986; Tokai y col., 2007). También se han caracterizado como reguladores positivos los genes *tri6* y *tri10*. *tri6* codifica un factor de transcripción “dedo de zinc” que regula todos los genes *tri* identificados (Hohn y col., 1999; Gallo y col., 2004; Ochiai y col., 2007) y *tri10* regula, a su vez, el gen *tri6* (Tag y col., 2001; Peplow y col., 2003a). Sin embargo, una disrupción de *tri10* no causa una pérdida completa de la transcripción de los genes *tri6*, *tri5*, *tri4*, y *tri101*. Además, la disrupción de *tri6* implica la no producción de la toxina T2, y disminuye marcadamente o elimina la expresión de *tri4* y *tri5* (Tag y col., 2001; Kimura y col., 2007).

Otros genes implicados en la ruta de los trichotecenos son (Figura 8): *tri3*, que codifica una 3-acetiltrichoteceno 15-O acetiltransferasa; *tri11*, una isotrichodermina C-15 hidroxilasa; *tri12*, una proteína transportadora (bomba de eflujo) implicada en la secreción de trichotecenos de tipo B (TCTB) que contribuye como un mecanismo de protección y salida de productos fuera de la célula (Kimura y col., 2007); *tri7*, una 3-acetiltrichoteceno 4-O acetiltransferasa; y *tri13*, una 3-acetiltrichoteceno C4-hidroxilasa (Desjardins y col., 1986; Desjardins y col., 1993; Kimura y col., 2003; Tokai y col., 2007). Al día de hoy, los genes *tri9* y *tri14* no tienen asignada una función.

Por otro lado, se han descrito 12 ORFs localizados en posición 12-13 kb aguas arriba y 14-16 kb aguas abajo del centro del *cluster* de genes *tri* que no son requeridos en la biosíntesis de los trichotecenos, pero que podrían estar implicados en la patogénesis en planta, ya que codifican proteínas similares a enzimas que detoxifican fitoalexinas o que degradan paredes celulares vegetales (Brown y col., 2003).

También se han identificado otros tres genes que se encuentran localizados en zonas del genoma alejadas del *cluster tri* (Brown y col., 2004) (Figura 9). El gen *tri101* que codifica una isotrichodermol 3-O acetiltransferasa (Tag y col., 2001), implicado en la síntesis de 15-diacetilcalonectrina a partir de isotrichodermol (Kimura y col., 1998 y 2007). *tri101* se encuentra flanqueado por dos genes *house-keeping*: *tri1* que codifica una 3-acetiltrichoteceno C-8 oxigenasa (Brown y col., 2003; Meek y col., 2003) y *tri16* que codifica una C-8 aciltransferasa (Brown y col., 2003; Peplow y col., 2003b). Estos dos últimos genes forman un *tandem* que se encuentra flanqueado por genes no relacionados con la biosíntesis de trichotecenos.

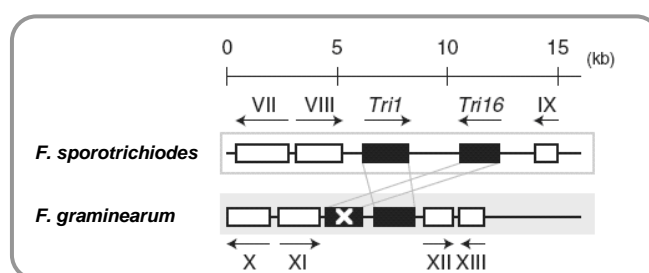


Figura 9. Representación esquemática de los genes *tri1* y *tri16*, que se localizan fuera del “*cluster tri*”, en *F. sporotrichioides* y *F. graminearum*. La X en la caja indica que el gen ha sido inactivado por mutaciones. Las cajas blancas representan genes que codifican para proteínas no relacionadas con la biosíntesis de trichotecenos. Tomado de Kimura y col. (2007).

Por otro lado, se identificó el gen *tri15*, que codifica un factor de transcripción en “dedos de zinc”, como un regulador negativo de la biosíntesis de trichotecenos en *F. sporotrichioides*. Este gen no está regulado por *tri6*, y se ha observado que cuando *tri15* está fuertemente expresado, su transcrito no es detectable (Alexander y col., 2004).

En la Tabla 1 se recogen los genes *tri* y las actividades codificadas por cada uno de ellos (Brown y col., 2004; Kimura y col., 2007).

A pesar de la gran importancia toxicológica y biotecnológica que pueden tener los trichotecenos, este aspecto de la biología de *Trichoderma* no se ha investigado a fondo. Hasta la fecha, y en comparación con *Fusarium*, sólo un pequeño número de trichotecenos como trichothecinol A, trichodermina o harzianum A, han sido aislados en *Trichoderma*.

Tabla 1. Genes implicados en la biosíntesis de trichotecenos y sus funciones.

Gen	Función
<i>tri1</i>	C-7/C-8 hidroxilasa
<i>tri3</i>	C-15 acetiltransferasa
<i>tri4</i>	C-2 hidroxilasa
<i>tri5</i>	trichodieno sintasa
<i>tri6</i>	regulador positivo
<i>tri7</i>	C-4 acetiltransferasa
<i>tri8</i>	C-3 esterasa
<i>tri9</i>	desconocido
<i>tri10</i>	regulador positivo
<i>tri11</i>	C-15 hidroxilasa
<i>tri12</i>	bomba de eflujo
<i>tri13</i>	C-4 hidroxilasa
<i>tri14</i>	desconocido
<i>tri15</i>	regulador negativo
<i>tri16</i>	C-8 acetiltransferasa
<i>tri101</i>	C-3 acetiltransferasa

5. GENÓMICA FUNCIONAL

5.1. Concepto

Desde el nacimiento de la biología molecular, los investigadores han planteado e intentado resolver los problemas biológicos estudiando la función de genes y productos génicos de forma individualizada. Esta aproximación “reduccionista” ha demostrado ser enormemente fructífera y se han llegado a descubrir numerosos principios biológicos.

Sin embargo, a pesar del considerable éxito que ha supuesto la biología molecular, muchas preguntas biológicas fundamentales permanecen sin respuesta. Este hecho se debe a que la mayoría de los productos génicos actúan de forma conjunta y, por tanto, los procesos biológicos deben considerarse como redes complejas cuyos componentes están interconectados (Ge y col., 2003).

La secuenciación del primer genoma, el bacteriófago ϕ X174, abrió la era de la genómica (Sanger y col., 1978). En la actualidad, la genómica está en un momento de transición o evolución, se está pasando del “mapeo” y secuenciación de genomas, al estudio de la función de los genes. Por esta razón, el análisis de genomas se divide en “Genómica estructural” (la generación y análisis de información sobre los genes de un genoma) y “Genómica funcional” (la generación y análisis de información sobre lo que hacen los genes). El objetivo de la genómica funcional es conseguir la mayor información posible sobre los genes de la forma más rápida.

A partir del concepto de genómica han surgido otros términos que son equivalentes lingüísticos pero referidos a otros campos de estudio, dentro de los cuales se incluyen la proteómica, la transcriptómica y la metabolómica.

Proteómica es el estudio del proteoma o conjunto de proteínas que se sintetizan diferencialmente en una célula o un organismo bajo condiciones definidas y en un momento determinado (Lorito y col., 2010). Transcriptómica es el estudio del ARN mensajero y de los genes que son transcritos de forma activa. El desarrollo y la diferenciación de una célula o un organismo, así como la adaptación a condiciones variables, se determina en gran medida por el perfil de expresión génica. Metabolómica es el estudio de los metabolitos y de las redes metabólicas.

Todas estas aplicaciones se basan en el desarrollo de tecnologías de alto procesamiento o ensayos “*high-throughput*” y reciben el nombre genérico conjunto de “ómicas” (Rey y col., 2004, Lorito y col., 2010).

La rápida y masiva acumulación de datos procedentes de las distintas aproximaciones “ómicas” representa la base de un nuevo tipo de ciencia biológica. En este campo, la bioinformática tiene cada vez un papel más relevante ya que las bases de datos se han convertido en un elemento esencial de estudio, especialmente en las etapas iniciales de cualquier investigación biológica.

La mayor parte de los proyectos de genómica funcional comienzan por la obtención y análisis de colecciones de *Expressed Sequence Tags* (ESTs). Estas colecciones se obtienen a partir de clones de ADNc que se secuencian parcialmente, por lo que derivan de genes que se expresan en unas condiciones determinadas y a unos tiempos concretos. Las ESTs se agrupan en conjuntos de secuencias redundantes (contigs) y no redundantes (unisecuencias) en los que cada grupo representa un gen putativo único en el genoma del organismo (Skinner y col., 2001).

5.2. Genómica funcional de hongos filamentosos

Los hongos filamentosos constituyen la base de muchas aplicaciones biotecnológicas: desde el desarrollo y producción de diferentes fármacos (por ejemplo, los antibióticos β -lactámicos) y enzimas industriales (entre otras, celulasas y lipasas), hasta su uso como sistemas para la expresión homóloga y heteróloga de diferentes productos génicos. A pesar de la gran importancia de los hongos filamentosos, los recursos que se destinan a su estudio son muy limitados en comparación con el esfuerzo total que se está llevando a cabo en otros campos de la genómica (Yoder y Turgeon, 2001).

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios de ESTs de hongos filamentosos y oomicetos, incluyendo *Neurospora crassa* (Hynes, 2003), *Pleurotus ostreatus* (Lee y col., 2002), *Verticillium dahliae* (Neumann y Dobinson, 2003), *Metarhizium anisopliae* (Freimose y col., 2003), *G. zeae* (Trail y col., 2003), *Aspergillus oryzae* (Kobayashi y col., 2007), *Ustilago maydis* (Austin y col., 2004; Nugent y col., 2004), *Magnaporthe grisea* (Ebbole y col., 2004), *Mycosphaerella graminicola* (Keon y col., 2005; Goodwin y col., 2007), *Phytophthora parasitica* (Panabieres y col., 2005) y *Uromyces fabae* (Jakupovic y col., 2006). En cuanto a *Trichoderma*, la mayoría de los estudios se han basado en la utilización de herramientas de secuenciación del genoma y ESTs, así como de expresión utilizando *macro* y *microarrays* (Lorito y col., 2010).

5.3. Genómica funcional de *Trichoderma*

En cuanto al género *Trichoderma*, hay varios trabajos publicados de genómica. El primero fue un análisis de ESTs y *microarrays* en el que se estudiaba la degradación aerobia y anaerobia de la glucosa en *T. reesei* QM9414 (Chamberg y col., 2002). La base de datos completa de ESTs se encuentra en la página web: <http://trichoderma.iq.usp.br/TrEST.html>.

Otras investigaciones de secuenciación de ESTs del género *Trichoderma* han permitido la identificación de enzimas, reguladas transcripcionalmente, implicadas en la degradación de biomasa (Foreman y col., 2003) o el estudio de rutas de secreción y procesamiento de proteínas (Diener y col., 2004). Se han identificado distintos genes implicados en el control biológico (Liu y Yang, 2005) y genes que se expresan diferencialmente en respuesta a determinadas condiciones de estrés (Arvas y col., 2006).

Además de estos trabajos basados en la generación de ESTs, el *Joint Genome Institute* (JGI, dependiente del Departamento de Energía de EE.UU.) ha realizado proyectos de genómica estructural, proporcionando la secuencia completa del genoma de la cepa *T. reesei* QM 9414 (34 Mbp y 9.130 modelos de genes) y ha finalizado la secuenciación de los genomas de *T. virens* Gv29-8 (38.8 Mbp y 11.643 modelos de genes) y *T. atroviride* IMI206040 (36.1 Mbp y 11.100 modelos de genes). La información de estos trabajos se encuentra en la página web: http://genome.jgi-psf.org/TriviGv29_8_2/TriviGv29_8_2.home.html (versión 2.0) y <http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html> (versión 2.0). Actualmente, nuestro grupo está colaborando en la anotación comparativa de los genomas de *T. virens* y *T. atroviride* (M.R. Hermosa y E. Monte, comunicación personal).

En la última década, el análisis de proteómica en hongos biotecnológicamente importante se ha desarrollado significativamente, con relativamente pocos casos estudiados en comparación con las numerosas especies donde el genoma ha sido secuenciado. *T. harzianum* fue el primer hongo filamentoso para el cual se realizó espectrometría de masa [*matrix assisted*

laser desorption/ionization-time of flight (MALDITOF)] y cromatografía líquida de masas en tandem (LC-MS-MS)] para mejorar el método de identificación de proteínas después de realizar la clásica electroforesis bidimensional (Lorito y col., 2010).

Además, se han analizado proteínas mitocondriales MAPKs de *T. harzianum* (Grinyer y col., 2004), secretomas de *T. harzianum* y *T. atroviride* (Suárez y col., 2005; Seidl y col., 2006), hidrofobinas de varias especies (Neuhof y col., 2007), el peptaiboma de *T. virens*, *T. reesei* y *T. atroviride* (Stoppacher y col., 2008), y preparaciones comerciales de celulasa de *T. reesei* (Jeoh y col., 2008; Nagendran y col., 2009).

Por otro lado, las investigaciones centradas en el proteoma de cepas de biocontrol de *Trichoderma*, principalmente de *T. harzianum* y *T. atroviride*, ha permitido la identificación de muchos factores clave probablemente involucrados en la interacción hongo-*Trichoderma* o *Trichoderma*-planta. El análisis del proteoma de *Trichoderma* revela una serie de factores aparentemente involucrado en muchas de las diversas respuestas de estos hongos en la simbiosis, antagonismo, saprofitismo, etc. Algunas de estas proteínas como las ciclofilinas, hidrofobinas, los transportadores ABC y factores de estrés, así como enzimas (chitinasas, glucanasas, proteasas, xilanasas, celulasas, lipasas, poligalacturonasas, chitosanasas, etc.) o MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) son seleccionadas para aplicaciones biotecnológicas que incluyen la expresión transgénica (Lorito y col., 2010).

El proyecto *TrichoEST*, financiado por la Unión Europea, punto de partida del presente trabajo, tenía como objetivo la identificación de genes y productos génicos de *Trichoderma* spp. con valor biotecnológico. En este estudio se construyeron 26 genotecas de ADNc, utilizando poblaciones de ARNm obtenidas bajo condiciones que simulaban procesos de biocontrol, estreses nutritivos e interacción con planta, a partir de 10 cepas pertenecientes a 8 especies diferentes de *Trichoderma* (Rey y col., 2004). La información relacionada con *TrichoEST* se encuentra en la página web: <http://www.trichoderma.org>. De los casi 34.000 clones que se secuenciaron en el proyecto, 8.710 ESTs procedían de 8 genotecas de ADNc de la cepa *T. harzianum* T34, y 8.160 de 4 genotecas obtenidas a partir de las cepas *T. longibrachiatum* T52, *T. asperellum* T53, *T. virens* T59 y *Trichoderma* spp. T78 (Vizcaíno y col., 2006b y 2007).

6. ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN GÉNICA

Una de las estrategias para analizar la función de los productos génicos consiste en la sobreexpresión de los genes en sistemas homólogos o heterólogos. La sobreexpresión de genes implicados en el micoparasitismo se ha utilizado como estrategia para incrementar la capacidad antifúngica de numerosas cepas de *Trichoderma*. Por citar sólo algunos ejemplos, la sobreexpresión en *T. longibrachiatum* (una especie no considerada agente de biocontrol) del gen que codifica una β -1,4-endoglucanasa incrementó su capacidad antifúngica frente a

Pythium ultimum (Migheli y col., 1998), y transformantes de *T. harzianum* que sobreexpresan el gen que codifica una proteína de choque térmico (*hps23*) de *T. virens* mostraron una mayor resistencia a temperaturas extremas (Montero-Barrientos y col., 2007).

Otra estrategia para determinar la función biológica de una proteína es examinar el fenotipo de organismos que contienen mutaciones en el gen codificante para la misma. Una vía de estudio puede ser aislar mutantes nulos mediante el escrutinio de una colección previamente obtenida por mutagénesis o, si es posible, mediante la interrupción del *locus* de interés utilizando *cassettes* apropiados, mostrándose esta última aproximación como la más útil y efectiva. Sin embargo, existen muchos organismos en los que esta técnica no representa una herramienta eficaz, ya que depende directamente de la frecuencia de recombinación homóloga propia de cada sistema. *Trichoderma* representa uno de los casos en los que la frecuencia de recombinación homóloga es baja (alrededor del 2% en *T. reesei*) aunque varía según la cepa (Mach y Zeilinger, 1998). Por ello, sólo se han descrito algunos casos de interrupciones génicas con éxito en este género: *T. virens*, *T. atroviride*, *T. reesei* (Mach y col., 1994; Wilhite y col., 2001; Zeilinger, 2004) y, más recientemente, en la cepa T34 de *T. harzianum* (Rosado y col., 2007; Rubio y col., 2008).

En *T. harzianum*, la estrategia de silenciamiento ha permitido asignar función a genes que participan en la ruta de terpenos y, a su vez, relacionarlos con el biocontrol (Cardoza y col., 2006b y 2007). También se han silenciado genes de respuesta a estrés como *Thhog1*, que está implicado en la respuesta hiperosmótica y en la interacción con hongos fitopatógenos (Delgado-Jarana y col., 2006).

En el campo de la genómica, el uso de *macroarrays* y *microarrays* representa una herramienta útil a la hora de estudiar, de manera simultánea, la expresión de miles de genes. El acceso a colecciones de datos de perfiles de expresión de mutantes, tejidos celulares o tratamientos, ofrece una herramienta para la identificación de la función de los genes (Ju y col., 2009). Los *macroarrays* han sido utilizados para identificar clones y promotores de *Trichoderma* en respuesta a estímulos ambientales específicos y poder estudiar la interacción entre *Trichoderma* y plantas de cacao o de tomate. Por ejemplo, durante la asociación endofítica de *T. ovalisporum* y *T. harzianum* con la planta de cacao se ha observado una represión de serina proteasas. Además de expresión diferencial de genes que codifican transportadores ABC, utilizados probablemente por el hongo para neutralizar el efecto de toxinas de la planta y otras proteínas involucradas en reacciones de oxido-reducción y en el metabolismo del azúcar (Bailey y col., 2006). Los *macroarrays* también han sido utilizados para analizar el perfil de expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, tráfico de vesículas celulares, fusión de membrana, síntesis de pared celular, transporte de azúcares y aminoácidos, metabolismo redox y de procesos relacionados con energía. Estos genes se encuentran regulados durante la interacción con raíces de plantas de tomate (Chacón y col., 2007; Lorito y col., 2010).

Además, existen diferentes tipos de *microarrays* dependiendo del material de partida con el que se trabaje, proteínas, tejidos (*Tissue Microarray*, TMA), ADN (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH) o ARN (*microarrays* de expresión). La tecnología de los *microarrays* está basada en la síntesis o fijación de sondas específicas que representan los genes, proteínas o metabolitos, sobre un formato sólido que permitirá la hibridación con la molécula diana (Lee y Saeed, 2007; Miller y Tang, 2009). Actualmente existen dos tipos de *microarrays* de expresión: de ADNc y de oligonucleótidos (Schulze y Downward, 2001). Las ventajas que presentan los *microarrays* de oligonucleótidos con respecto a los de ADNc, es que tienen una fabricación rápida y más robotizada, presentan una elevada reproducibilidad y especificidad, ya que se utilizan secuencias cortas y muchas sondas por gen. Por el contrario, requiere equipamiento más especializado, por lo que su coste es elevado, y presenta poca flexibilidad en el diseño experimental.

Recientemente, se utilizó un *microarray* de alta densidad (HDO), compuesto por sondas diseñadas contra 14.081 ESTs basadas en transcritos de la base de datos TrichoEST y 9.121 transcritos derivados del genoma de *T. reesei* (Martínez y col., 2008), para analizar la expresión génica de *T. harzianum* CECT 2413 en un medio mínimo o en la presencia de tomate, quitina o glucosa. Los resultados indicaron que *T. harzianum* es capaz de modificar sustancialmente su perfil de expresión génica en función de la fuente de carbono disponible (Samolski y col., 2009).

OBJETIVOS

Objetivos_____

Este trabajo se enmarca dentro de un proyecto de genómica funcional del género *Trichoderma* dirigido a la identificación de genes con valor biotecnológico en este hongo. *T. brevicompactum* ha sido recientemente descrito y, por tanto, es una especie poco conocida. Sin embargo, dentro de las actividades biológicas descritas para esta especie destaca la antibiosis. En este sentido, se describe para especies de *Fusarium* spp. que uno de los pasos críticos en la ruta de síntesis de compuestos terpénicos con actividad antibiótica está catalizado por una trichodieno sintasa, codificada por el gen *tri5*. En la especie *T. arundinaceum* se ha aislado el gen *tri5*, requerido en la biosíntesis de los trichotecenos. Además se ha evidenciado la presencia de este gen en otras especies como *T. harzianum*, *T. viride* y *T. atroviride* (Gallo y col., 2008). Sin embargo es muy poco lo que se conoce de los genes de esta ruta en *T. brevicompactum*. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es el aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Tbtri5* en *T. brevicompactum* IBT 40841, una cepa en la que previamente se ha demostrado la producción de trichodermina. Para lograr este objetivo, se explorará la actividad biológica de dicha cepa, principalmente su capacidad antimicrobiana y sus mecanismos de citotoxicidad. A continuación se detallan los objetivos específicos de esta tesis:

1. Aislar del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841, que codifica una trichodieno sintasa.
2. Caracterizar y analizar la expresión del gen *Tbtri5* en *T. brevicompactum* IBT 40841.
3. Analizar funcionalmente el gen *Tbtri5*, mediante su sobreexpresión en *T. brevicompactum* IBT 40841, estudiando sus actividades antimicrobianas y citotóxicas.

Objetivos_____

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ORGANISMOS UTILIZADOS

1.1. Bacterias

***Agrobacterium tumefaciens* AGL1:** (Lazo y col., 1991), cepa utilizada para la transformación de la cepa silvestre *T. brevicompactum* IBT 40841. Presenta resistencia natural a rifampicina (25-50 µg/mL) y a carbenicilina (100-200 µg/mL).

***Escherichia coli* DH5α:** (Hanahan, 1983), cepa utilizada en experimentos de transformación por choque térmico debido a la alta eficacia que puede conseguirse con ella (hasta 5×10^8 transformantes por cada µg de ADN). Entre sus características destaca poseer una delección en el gen *Z* del operón *lac*, lo que permite seleccionar por color las células transformadas que contengan plásmidos que complementen dicha delección, tales como pBluescript® KS+ (Stratagene; *la información referente a cada casa comercial se indica en el apartado 17 de Materiales y Métodos).

***Escherichia coli* XL1-Blue MRA (P2):** cepa lisógena para el fago P2, utilizada para detectar recombinantes Spi- derivados de vectores fágicos. Incluida en el kit lambda DASH II/BamHI vector (Stratagene).

Otras cepas bacterianas: Se utilizaron cepas bacterianas de la colección de “Merck Sharp & Dohme” (MSD) para ensayos de actividad antimicrobiana (Tabla 2).

En algunos ensayos de actividad antimicrobiana se utilizaron aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* multirresistente, *Enterococcus faecalis* vancomicina resistente, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente y *Staphylococcus aureus* fenotipo meticilino resistente (MRSA). Estas cepas se aislaron en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Salamanca y se incluyeron en ensayos de actividad por ser agentes causantes de infecciones intrahospitalarias con un perfil de multirresistencia.

1.2. Cepas de levaduras

Se utilizaron para ensayos de actividad antimicrobiana las cepas de *Candida albicans* MY 1055 [aislamiento originario del *Williamsburg Community Hospital*, Williamsburg, Virginia, EE.UU., como cepa MCV 7270, (Bartizal y col., 1992)], *C. glabrata* MY 992 y *C. tropicalis* MY 1012, pertenecientes a la colección de MSD. Estos microorganismos destacan por ser patógenos oportunistas que causan infecciones sistémicas, particularmente en pacientes inmunosuprimidos. Se usaron como controles los antibióticos higromicina a 300 µg/mL y anfotericina B a 0,25 µg/mL (Bartizal y col., 1992).

Además, *Kluyveromyces marxianus* CECT 1018 (CECT: Colección Española de Cultivos Tipo) y *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1383, fueron utilizadas para bioensayos de actividad antimicrobiana. Ambas cepas poseen el fenotipo de ser sensibles a trichotecenos. También se usaron como controles los antibióticos higromicina a 300 µg/mL y anfotericina B a 0,25 µg/mL.

Tabla 2. Características de las cepas bacterianas de la colección “Merck Sharp & Dohme” (MSD)

Microorganismo	Características	Antibióticos usados como control ^a
<i>Acinetobacter baumannii</i> MB 5973	Sobrepresión de cefalosporinas (AmpC) Resistencia a aminoglicósidos, β-lactámicos, imipenem	Ciprofloxacino (0,125-0,016 µg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> MB 964	Cepa silvestre	Higromicina 300 µg/mL
<i>Escherichia coli</i> MB 5746	Presencia de genes <i>lpxC</i> (biosíntesis de lípido A del LPS) y <i>tol1C</i> (síntesis de proteínas de membrana externa) Resistencia por eflujo a antibióticos hidrofílicos e hidrofóbicos	Novobiocina (25-3,13 µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> MB 4926	Mutación del gen <i>envA1</i> - (afecta la síntesis de LPS) Resistencia aumentada a rifampicina y β-lactámicos	Gentamicina 50 µg/mL
<i>Enterococcus faecium</i> MB 5571	Resistencia a vancomicina y β-lactámicos	Penicilina G 32 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MB 979/ MB 5919	Resistencia a cefalosporinas de tercera generación, macrólidos, penicilina e imipenem	Gentamicina 50 µg/mL / Ciprofloxacino (0,125-0,016 µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> MB 5349 / MB 167	Fenotipo MRSA (resistente a meticilina, β-lactámicos, carbapenemes, aminoglucósidos, macrólidos, clindamicina y tetraciclina) / Fenotipo MSSA (sensible a meticilina)	Kanamicina 0,5 µg/mL Claritromicina 0,65 µg/mL / Penicilina G (0,312-0,039 µg/mL)

^a Los antibióticos señalados con una concentración fija se usaron en el ensayo de actividad antimicrobiana en placa, y los que aparecen expresados en un rango de concentración fueron utilizados como curva control en los ensayos de actividad en medio líquido.

1.3. Hongos filamentosos

1.3.1. Cepas de *Trichoderma*

T. brevicompactum IBT 40841: esta cepa pertenece a la colección del *Department of Biotechnology* de la *Technical University of Denmark*. Originalmente fue aislada de suelo de Alshter (Irán), se caracteriza por ser productora de trichodermina, y en esta cepa no se ha documentado la producción de peptaibióticos ni de hidrofobinas (Nielsen y col., 2005; Dengenkolb y col., 2008a).

Otras cepas de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Otras cepas de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo.

Referencia	Especie	Cepa ^a	Fuente ^b	Origen geográfico
T11	<i>T. atroviride</i>	IMI 352941	suelo	Francia
T22	<i>T. harzianum</i>	ATCC 20847	fusión de protoplastos de las cepas ATCC 20737 y ATCC 60850	EE.UU.
T25	<i>T. asperellum</i>	IMI 296237	suelo	Colombia
T34	<i>T. harzianum</i>	CECT 2413	suelo	EE.UU.
T52	<i>T. longibrachiatum</i>	NBT 52	planta de tratamiento de agua	Eslovaquia
T59	<i>T. virens</i>	NBT 59	suelo de tabaco tratado con quitosano	España

^a IMI: *International Mycological Institute*, CABI Bioscience, Egham, Reino Unido. ATCC: *American Type Culture Collection*, Manassas, Virginia, EE.UU. CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia, España. NBT: NewBiotechnic S.A., Sevilla, España. ^b La cepa T22 fue obtenida mediante fusión de protoplastos.

1.3.2. Hongos fitopatógenos

Las cepas de hongos fitopatógenos usadas en este trabajo fueron: *B. cinerea* cepa 98 (aislado de planta de fresa en nuestro laboratorio), *Fusarium oxysporum* cepa CECT 2866, *R. solani* CECT 2815 y *Pythium irregulare* (Staswick y col, 1998).

1.3.3. Otros hongos filamentosos

Aspergillus fumigatus MF 5668 (MSD): cepa aislada originalmente de una lesión pulmonar humana, utilizada para los ensayos de actividad antimicrobiana, frente a la cual se utilizó el antibiótico anfotericina B a 0,25 µg/mL como control. Esta cepa procede de la *American Type Culture Collection* (ATCC), como cepa ATCC 13073. Destaca por ser un patógeno oportunista que causa infecciones sistémicas, particularmente, en pacientes inmunosuprimidos.

1.4. Líneas celulares

Se utilizaron líneas celulares comerciales de la ATCC o Tebu-bio[®], para realizar los ensayos de actividad antitumoral y citotóxica. La designación, número de ATCC y procedencia de estas líneas se indican en la Tabla 4.

1.5. Material vegetal

Para la realización de los estudios de germinación y crecimiento se utilizaron semillas de *Lycopersicon esculentum* var. manitú híbrido (Ramiro Arnedo S.A., Calahorra, La Rioja).

Tabla 4. Líneas celulares utilizadas en este trabajo.

Designación	Número ATCC [®]	Procedencia
A-549	CCL-185 TM	queratina de carcinoma de pulmón
Hep-G2	HB-8065 TM	carcinoma hepatocelular
Hep-3B ^a	HB-8064 TM	carcinoma hepatocelular
HT-29	HTB-38 TM	adenocarcinoma colorrectal
MCF-7	HTB-22 TM	adenocarcinoma de epitelio de glándula mamaria
MES-SA ^b	CRL-1976 TM	sarcoma uterino
MES-SA/Dx5 ^c	CRL-1977 TM	sarcoma uterino
184-A1 ^d	CRL-8798 TM	epitelio sano de glándula mamaria
CCD-16Lu ^d	CCL-204 TM	fibroblasto de pulmón sano
ZBhu001010	-	criopreservado de hepatocitos maduros humanos sano (Tebu-bio [®])

Tomado de *The Global Bioresource Center* (ATCC) o Tebu-bio[®].

^a Contiene integrado el genoma del virus de hepatitis B. ^b Presenta resistencia a vinblastina, dacarbazina, cisplatina, melfalan, vincristina, metotrexato y etoposide y sensibilidad a doxorubicina, dactinomicina, mitomicina C, taxol y bleomicina. ^c Presenta resistencia a doxorubicina, marcada resistencia cruzada a agentes quimioterapéuticos como vinblastina, taxol, colchicina, vincristina, etoposide, dactinomicina, mitoxantrona y daunorubicina, y moderada resistencia cruzada a mitomicina C y melfalan. Sensibilidad a bleomicina, cisplatino, carmustina, 5-fluorouracilo o metotrexato. ^d Línea celular no maligna.

2. VECTORES UTILIZADOS

2.1. Vectores plasmídicos

- **pBlueScript[®] KS+** (Stratagene) (2961 pb): Plásmido derivado del vector pUC19, utilizado para la clonación de fragmentos de ADN. Contiene un origen de replicación en *E. coli* del plásmido pBR322 (colE1), un origen de replicación monocatenario del fago f1, y un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en *E. coli*. Además contiene un fragmento del gen *lacZ* (subunidad α) capaz de complementar la mutación existente en algunas cepas de *E. coli* en el gen de la β -galactosidasa, dando un color azul a las cepas crecidas en presencia de isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG), que es un fuerte inductor del gen *lacZ*, y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal), un sustrato que provoca la coloración azul al ser degradado por la β -galactosidasa. La presencia de un inserto de ADN en el fragmento del gen *lacZ* del plásmido evita la coloración azul de las colonias al no existir complementación, permitiendo la selección de los clones que contienen el inserto por el color (Figura 10).

- **pAN 52-1** (Punt y col., 1987) (5721 pb): Plásmido derivado del vector pUC18, que contiene un *cassette* formado por el gen *hph* de *E. coli*, que confiere resistencia a higromicina en hongos filamentosos, bajo el control del promotor del gen *gpdA* (codifica la gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasa) y del terminador del gen *trpC*, ambos de *Aspergillus nidulans*. Presenta un sitio *NcoI*, el cual puede ser removido por tratamiento con polimerasa Klenow. Utilizado para realizar la clonación del gen *Tbtri5* en el sitio de corte *BamHI*, y, realizando además un tratamiento con Klenow (Figura 10).

- **pUR5750** (de Groot y col., 1998; Cardoza y col., 2006a) (15727 pb): Plásmido derivado del vector pBin19, que contiene un *cassette* constituido por un gen *hph* de *E. coli* que confiere resistencia a higromicina en hongos filamentosos. Este gen se expresa bajo el control del promotor del gen *gpdA* (codifica la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) y del terminador del gen *trpC*, ambos de *A. nidulans*. Dicho *cassette* se encuentra entre las regiones “Left border” y “Right border” (LB y RB) de pBin19. Permite la selección por resistencia a kanamicina (km^R) al transformar en *E. coli* (Figura 10). Se empleó en la transformación de *T. brevicompactum* IBT 40841 mediada por *A. tumefaciens*.

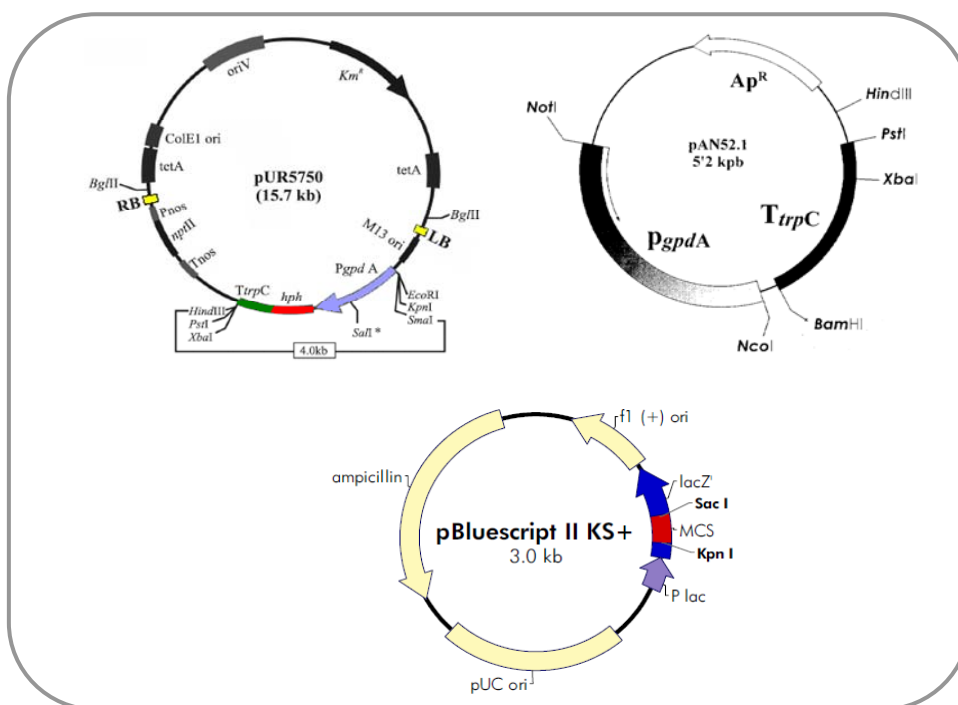


Figura 10. Esquema de los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo. Se indican los principales puntos de corte para enzimas de restricción.

2.2. Vectores fágicos

- **Lambda DASH® II** (Stratagene) (Frischauf y col., 1983) (43kb): Este vector se utilizó para construir una genoteca de ADN genómico de *T. brevicompactum* IBT 40841 (Figura 11). El vector de sustitución acepta fragmentos de ADN exógeno de entre 9 y 23 kb. Está formado por tres regiones: brazo izquierdo (20 kb), brazo derecho (9 kb) y una región central o “*stuffer*” (12,5 kb), y presenta las siguientes características:

- Dos sitios de clonación múltiple con sitios de reconocimiento para las enzimas *SalI*, *EcoRI* y *BamHI*, entre otras.
- En los brazos se encuentran los extremos cohesivos o sitios *cos*, necesarios para el empaquetamiento del ADN en las cápsidas del fago.
- En la región central se encuentran los genes *red* y *gam* (fenotipo Spi+), que hacen que estos fagos sean incapaces de formar placas de lisis en cepas de *E. coli* lisógenas de P2, mientras que los derivados recombinantes de *lambda* DASH II, al carecer de estos dos genes, sí son capaces de crecer en dichas cepas.

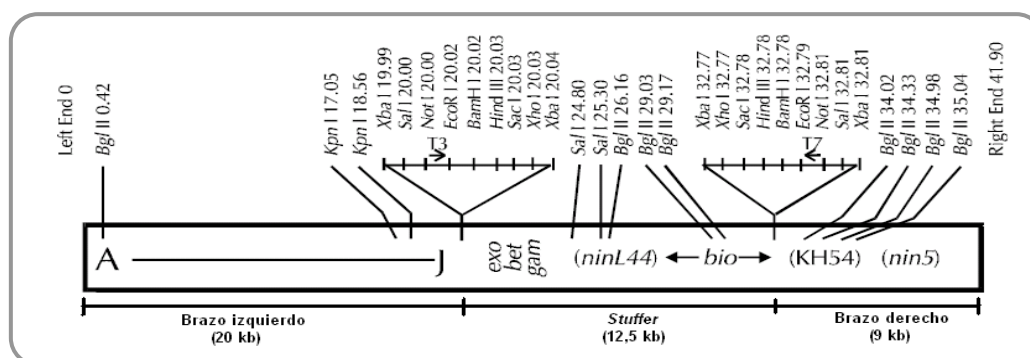


Figura 11. Mapa del vector *Lambda* DASH II. Representación de las tres partes que constituyen el vector *Lambda* DASH II, así como los sitios de corte para diferentes enzimas de restricción.

3. MEDIOS DE CULTIVO

Salvo que expresamente se indique otro método, los medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 1 atm durante 20 minutos.

3.1. Medios de cultivo para bacterias

- **Medio BHI (*Brain Heart Infusion*).** Utilizado para el crecimiento de *E. faecium*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Composición:

Extracto de cerebro	7,8 g
Extracto de corazón	9,7 g
Dextrosa	2 g
Fosfato de sodio	2,5 g
Peptona proteosa	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
H ₂ O destilada c.s.p	1 L

En caso de ser utilizado para el crecimiento de *Enterococcus* spp. el medio BHI se suplementó con vancomicina (10 mg/mL) y para el crecimiento de *S. aureus* el medio se suplementó con cloranfenicol (34 mg/mL).

- **Medio LB (*Luria-Bertani*)** (Miller, 1972). Se empleó como medio general para el crecimiento de *E. coli*.

Composición:

NaCl	10 g
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O destilada c.s.p	1 L

Se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 1 M. Para medio sólido se añadieron 15 g de agar por litro. El medio se suplementó con ampicilina (100 µg/mL) para la selección de bacterias portadoras de plásmidos con resistencia a dicho antibiótico. Para bacterias portadoras de plásmidos con selección por color (β-galactosidasa), el medio se suplementó con IPTG (25 µM) y X-gal (50 µg/mL).

- **Medio MH (*Mueller Hinton*)**. Utilizado como medio de crecimiento para *A. baumannii* y para la realización de la prueba de sensibilidad a los antibióticos por el procedimiento de Kirby Bauer.

Composición:

Infusión de carne	4 g
Caseína hidrolizada	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	15 g
H ₂ O destilada c.s.p	1 L

- **Medio MM-Hooykaas** (Hooykaas y col., 1979). Utilizado como medio mínimo para el crecimiento de *A. tumefaciens*.

Composición:

Tampón fosfato potásico pH 7,0	10 mL
Solución M-N	20 mL
CaCl ₂ ·2H ₂ O 1% (p/v)	1 mL
FeSO ₄ 0,01% (p/v)	10 mL
Elementos traza	5 mL
NH ₄ NO ₃ 20% (p/v)	2,5 mL
Glucosa 50% (p/v)	4 mL
H ₂ O destilada c.s.p	1 L

Tampón fosfato potásico pH 7,0: para 1 L de solución, K₂HPO₄ (200 g) y KH₂PO₄ (145 g).

Solución M-N: para 1 L de solución, MgSO₄·7H₂O (30 g) y NaCl (15 g).

Elementos traza: para 1 L de solución, ZnSO₄·7H₂O (100 mg), CuSO₄·5 H₂O (100 mg), H₃BO₃ (100 mg), MnSO₄·H₂O (100 mg) y Na₂MoO₄·2 H₂O (100 mg). Se ajustó el pH a 5,0.

- **Medio MI** (Hooykaas y col., 1979). Utilizado como medio de inducción de *A. tumefaciens*.

Composición:

Tampón fosfato potásico pH 7,0	10 mL
Solución M-N	20 mL
CaCl ₂ ·2H ₂ O 1% (p/v)	1 mL
NH ₄ NO ₃ 20% (p/v)	2,5 mL
MES (40 mM)	7,8 g
Glicerol 50% (p/v)	10 mL
H ₂ O destilada c.s.p 1 L	

Solución M-N

Composición:

MgSO ₄ ·7H ₂ O	30 g
NaCl	15 g

(*) Solución de metales traza, preparada a una concentración 1000x:

Composición:

FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 g/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,6 g/L
ZnSO ₄ ·H ₂ O	1,4 g/L
CoCl ₂	2 g/L

Se ajustó el pH a 5,5; esterilizándose por filtración si era medio líquido. En el momento de usarlo se añadieron 4 mL de glucosa al 50% (p/v) (10 mM), 5 mL de elementos traza (*), 10 mL de FeSO₄ al 0,01% (p/v) y acetosiringona (AS) a una concentración final de 200 µM. Si se trataba de medio sólido, la cantidad de glucosa que se añadió fue la mitad de la que llevaba el medio de inducción líquido (5 mM), y se añadieron además 15 g de agar antes de esterilizarlo.

- **Medio NBYE (Nutrient Broth - Yeast Extract)**. Utilizado para crecimiento de *B. subtilis*.

Composición:

Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g
Cloruro de sodio	5 g
H ₂ O destilada c.s.p 1 L	

- **Medio SOC**. Empleado para la recuperación de *A. tumefaciens* después de su transformación mediante electroporación y para la preparación de células competentes de *E. coli*.

Composición:

Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,50 g
KCL	0,19 g
H ₂ O destilada c.s.p 1 L	

Se ajustó el pH a 7,5 y una vez autoclavado y frío se añadieron 2 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y glucosa 20 mM filtrados por esterilidad.

- **Medio TSA.** Se utilizó como medio de selección en los experimentos de transformación de *Trichoderma*. Se añadieron al medio higromicina (100 $\mu\text{g/mL}$) y cefotaxima (300 $\mu\text{g/mL}$).

Composición:

Caldo de tripticasa soja (TSB)	30 g
Agar	15 g
H_2O destilada c.s.p 1 L	

3.2. Medios de cultivo para hongos y levaduras

- **Medio Bacto agar.** Se empleó como medio sólido para la determinación de la actividad antifúngica y antilevadura. Este medio fue adquirido a Sigma Aldrich, que lo presenta en forma de polvo, del que se resuspendieron 20 g en 1 L de agua destilada.

- **Medio CYS-80.** Se empleó como medio de cultivo para el crecimiento de hongos.

Composición:

Sacarosa	80 g
Harina de maíz amarillo	50 g
Extracto de levadura	1 g
H_2O destilada c.s.p 1 L	

- **Medio LM.** Utilizado como medio de cultivo para el crecimiento de *S. cerevisiae*.

Composición:

Glucosa	10 g
Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de malta	3 g
Agar	20 g
H_2O destilada c.s.p 1 L	

Se utilizó agar 2% para el crecimiento de levaduras y agar 1% para la realización de bioensayos con levaduras.

- **Medio MEA.** Se empleó como medio de cultivo sólido para el crecimiento de la cepa de *B. cinerea*.

Composición:

Peptona micológica	10 g
Extracto de malta	20 g
Agar	15 g
H_2O destilada c.s.p 1 L	

- **Medio Mínimo-Penttilä (MM).** Medio líquido de crecimiento de *Trichoderma* (Penttilä y col., 1987) que se utilizó para estudios de expresión.

Composición:

KH ₂ PO ₄	15 g
Glucosa	20 g
Solución de metales traza (*)	1 mL
H ₂ O destilada c.s.p	1 L

(*) Solución de metales traza: preparada a una concentración 1000x:

Composición:

FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 g/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,6 g/L
ZnSO ₄ ·H ₂ O	1,4 g/L
CoCl ₂	2 g/L

Una vez ajustado el pH a 5,5 con KOH y esterilizado en autoclave se añadieron 20 mL de (NH₄)₂SO₄ 250 mg/mL (esterilizado en autoclave), 4,1 mL de CaCl₂ 1M (esterilizado por filtración) y 2,4 mL de MgSO₄ 1M (esterilizado por autoclave).

Este medio se utilizó en todos los casos para realizar los ensayos de expresión (segunda fase), la fuente de carbono y/o nitrógeno varió dependiendo de las condiciones requeridas.

- **Medio PDA (*Potato Dextrose Agar*).** Se empleó como medio sólido general para el crecimiento de hongos.

Composición:

Extracto de patata	20 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
H ₂ O destilada c.s.p	1 L

Este medio se adquirió a Sigma Aldrich, que lo presenta en forma de polvo, del que se resuspendieron 39 g en 1 L de agua destilada. Cuando fue necesario, en estudios de expresión, el medio se suplementó con ácido ferúlico o tirosol.

- **Medio PDB (*Potato Dextrose Broth*).** Se empleó como medio de cultivo líquido general para el crecimiento de hongos.

Composición:

Extracto de patata	20 g
Glucosa	20 g
H ₂ O destilada c.s.p	1 L

Este medio se adquirió a Sigma Aldrich que lo presenta en forma de polvo, del que se resuspendieron 24 g en 1 L de agua destilada. Se utilizó en todos los casos para la obtención de biomasa o de crecimiento (primera fase) para realizar los estudios de expresión.

- **Medio RPMI.** Utilizado como medio de cultivo líquido para el crecimiento de *C. albicans* MY 1055.

Composición:

HEPES	40 mL
Glucosa	36 g
Yeast Nitrogen Base	6,7 g
RPMI 1640	1 Frasco

HEPES: [N-(2-Hidroxietilo) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico)], fue adquirido a Sigma Aldrich. Se utiliza por su capacidad de regulación de pH en rangos de pH 7,2-7,4 a 37°C.

RPMI 1640: se adquirió a Sigma Aldrich y es un filtrado estéril que contiene L-glutamina.

- **Medio SDB (*Sabouraud Dextrose Broth*):** Utilizado como medio de cultivo líquido general para el crecimiento de *C. glabrata* MY 992 y *C. tropicalis* MY 1012.

Composición:

Dextrosa	20 g
Peptona	10 g
H ₂ O destilada c.s.p 1 L	

En caso de ser necesario se utiliza agar 1% (10 g/L)

- **Medio TSA (*Tryptic Soy Agar*).** Este medio se utilizó en la selección de los transformantes de *Trichoderma*. Se añadieron 30 g/L de *Tryptic Soy Broth* (TSB, Merck) y 15 g/L de agar técnico (Difco Becton Dickinson). Se suplementó, cuando fue necesario, con higromicina (100 µg/mL) para la selección de los transformantes obtenidos por *A. tumefaciens*.

Composición:

TSB *	30 g
Agar	15 g
H ₂ O destilada c.s.p 1 L	

* TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Composición:

Caseína	17 g
Peptona micológica	3 g
Cloruro de sodio	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Dextrosa	2,5 g
H ₂ O destilada c.s.p 1 L	

- **Medio YPG-50.** Utilizado como medio de cultivo para el crecimiento de *K. marxianus*.

Composición:

Extracto de levadura	10 g
Peptona	10 g
Glucosa 50 mM	9,01 g
Agar	20 g
H ₂ O destilada c.s.p 1 L	

Se utilizó agar 2% para el crecimiento de levaduras y agar 1% para la realización de bioensayos con levaduras.

3.3. Medios de cultivo utilizados para líneas celulares

- **Medio EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*)**. Utilizado como medio base para las líneas celulares CCL-204, HB-8065, HB-8064, HTB-22 y ZBhu001010.

Composición:

Sales inorgánicas	9,14 g
Aminoácidos	1,38 g
Vitaminas	0,0081 g
Glucosa	1 g
Rojo fenol	0,01 g
Piruvato de sodio	0,011 g

El medio se suplementó con suero fetal bovino 10%, y cuando fue necesario se suplementó con insulina-bovina 0,01%.

- **Medio F-12K (*Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium*[®])**. Utilizado como medio base para la línea celular CCL-185.

Composición:

Sales inorgánicas	9,99 g
Aminoácidos	1,22 g
Vitaminas	0,041 g
Glucosa	1,26 g
Rojo fenol	0,00332 g
Piruvato de sodio	0,22 g
Ácido lipoico	0,00021 g

El medio se suplementó con suero fetal bovino 10%.

- **Medio HCMTM BulletKit[®]**. Utilizado como medio base para la línea celular ZBhu001010. El kit contiene HBMTM (Medio basal de hepatocitos EMEM) sin factores de crecimiento y HCMTM SingleQuots[®] el cual contiene ácido ascórbico, BSA-FAT (suero fetal bovino libre de ácidos grasos), transferrina, insulina, hEGF (factor de crecimiento epidermal humano), hidrocortisona y GA-1000 (geldanamycin).

- **Medio McCoy's 5A**. Utilizado como medio base para las líneas celulares CRL-1976, L-1977 y HTB-38.

Composición:

Sales inorgánicas	9,84 g
Aminoácidos	0,69 g
Vitaminas	0,059 g
Glucosa	3 g

Glutación reducido	0,0005 g
Bacto peptona	0,6 g
Rojo fenol	0,01 g

El medio se suplementó con suero fetal bovino 10%.

- **Medio MEGM (*Mammary Epithelial Growth Medium*)**. Utilizado como medio base para la línea celular CRL-8798.

Composición:

BPE*	13 mg/mL
Hidrocortisona	0,05 mL
hEGF**	10 µg/mL
Insulina	5 mg/mL
Transferrina	0,005 mg/mL
Toxina colérica	1 ng/mL

* **BPE**: extracto de pituitaria bovino

** **hEGF**: factor de crecimiento epidérmico humano

3.4. Medios de cultivo para plantas

- **Medio Murashige y Skoog (MS)** (Murashige y Skoog, 1962). Utilizado para la germinación de semillas de tomate.

Composición:

Medio MS básico	4,9 g
Sacarosa	10 g
MES	500 mg
Agar	8 g
H ₂ O destilada c.s.p	1L

Una vez ajustado el pH a 5,7 con KOH se esterilizó en autoclave. El medio MS básico fue adquirido a Duchefa y lleva como componentes: microelementos, macroelementos y vitaminas.

4. CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS

4.1. Trichoderma

4.1.1 Recogida de esporas

Para la obtención de esporas (conidios) de *Trichoderma* se cultivó este hongo en medio PDA a 25-28°C durante 7-10 días, tiempo suficiente para que la superficie de la placa estuviera cubierta de esporas. Estas se recogieron añadiendo 5 mL de agua destilada estéril por placa y raspando la superficie del agar con una espátula. A continuación, se filtró la suspensión de

esporas a través de un *eppendorf* conteniendo lana de vidrio para eliminar restos de micelio. Las esporas se almacenaron a 4°C hasta su uso (periodos de tiempo corto).

En el caso de *B. cinerea* cepa 98 el proceso fue similar al descrito para *Trichoderma*.

4.1.2. Cultivo para la extracción de ADN

Se utilizaron matraces de 250 mL conteniendo 100 mL de medio PDB, inoculados con esporas de *Trichoderma* a una concentración final de 10^6 esporas/mL, que se incubaron a 28°C durante 36-48 h, en agitación (150 rpm). La biomasa obtenida se recogió mediante filtración por vacío a través de papel de filtro. El micelio se lavó con agua destilada estéril, se congeló a -80°C y se liofilizó durante unas 12 h, conservándose a -20°C hasta su utilización.

4.1.3. Cultivo para el análisis de la expresión génica

Estos cultivos se realizaron en dos fases. En la primer fase (preinducción o producción de biomasa) se inocularon matraces de 100 mL conteniendo 25 mL de PDB, con esporas de *T. brevicompactum* a una concentración final de 10^6 esporas/mL. Se incubaron a 28°C durante 36-40 h, en agitación (150 rpm). Transcurrido este tiempo, los cultivos se filtraron en condiciones de esterilidad mediante vacío a través de papel de filtro. Los micelios se lavaron con agua destilada estéril y se utilizaron para inocular los medios de inducción (segunda fase). Estos medios se prepararon a partir de medio MM (Penttilä y col., 1987) con ciertas modificaciones en las condiciones nutricionales: ausencia de fuente de carbono (glucosa 0%); H_2O_2 (0,2 ó 0,5 mM); glucosa (1 ó 2%); sacarosa (1 ó 2%); glicerol (0,025, 0,1 ó 1%); paraquat (0,2 ó 0,5 mM); ácido ferúlico (0,25, 1 ó 5 mM) y tirosol (0,25, 1 ó 5 mM); o de pH (4 ó 8). Los diferentes medios se cultivaron durante uno, tres o siete días, a 28°C, en oscuridad y 200 rpm. Además se realizaron cultivos en medio MM a 15°C de temperatura y manteniendo el resto de condiciones de crecimiento.

- Para llevar a cabo extracciones de ARN (que se emplean en el análisis de la expresión génica), el micelio obtenido se recogió como se ha descrito para las preinducciones en el párrafo anterior. A continuación se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 12 h, conservándose a -80°C hasta su utilización.

4.2. *Lycopersicon esculentum* var. *manitú híbrido*

4.2.1. Desinfección de semillas

Las semillas de *L. esculentum* se desinfectaron mediante agitación durante 10 minutos en una solución de etanol al 70% y descartando el sobrenadante. Seguidamente se lavaron por agitación durante 10 minutos en una solución de lejía al 50%, se retiró el sobrenadante y se

lavarón tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se dejaron secar y se guardaron en una placa Petri estéril a temperatura ambiente hasta su uso.

5. MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

5.1. Bacterias

Las bacterias se mantuvieron durante periodos de tiempo cortos en placas Petri a 4°C selladas con Parafilm®. Para periodos más largos, se prepararon suspensiones de las mismas en glicerol al 15% (v/v) y se conservaron a -80°C.

5.2. Hongos filamentosos

El mantenimiento de las cepas fúngicas en el laboratorio se llevó a cabo por resiembras periódicas en placas Petri usando PDA como medio de cultivo. Las placas se inocularon depositando en el centro cilindros de agar, procedentes de cultivos anteriores, o con gotas de una suspensión de esporas, y se incubaron a 25-28°C. Una vez que los cultivos habían crecido, las placas se conservaron a 4°C selladas con Parafilm® durante periodos inferiores a un mes. Para preservar la viabilidad de la colección durante periodos más largos de tiempo, se recogieron las esporas como se describe en el apartado 4.1.1, se prepararon suspensiones en glicerol al 15% (v/v) o bien en DMSO al 7% (v/v), y se conservaron a -80°C.

- En el caso de *R. solani* y *P. irregulare*, se recogieron discos de agar que se mantuvieron en agua estéril y a temperatura ambiente.

5.3. Plantas

Las semillas de *L. esculentum* se mantuvieron a temperatura ambiente en placas Petri selladas.

6. COSTRUCCIÓN DE VECTORES

6.1. Construcción del vector pURSPT5

El vector pURSPT5 se utilizó para sobreexpresar el gen *Tbtri5* en *T. brevicompactum* IBT 40841. Para su construcción, inicialmente se aisló el gen mediante PCR utilizando ADN total de la propia cepa, los oligos Tri5Tb-5 y Tri5Tb-3b y la enzima *Pfu* polimerasa (Fermentas Life Science). Una vez aislado, el gen *Tbtri5* (fragmento de 1226 pb) se clonó en el sitio de corte *Bam*HI del vector pAN52-1 (tratado previamente con el fragmento klenow), que contiene el

promotor del gen *gpdA* y el terminador del gen *trpC* de *A. nidulans*, dando lugar al plásmido pSPT5 de 6947 pb. El *cassette* SPT5 (promotor *gpdA*, gen *Tbtr5* y terminador del gen *trpC*), de 4258 pb, fue amplificado con la *Pfu* polimerasa y los oligos pAN52-gpdA y pAN52-trpC. El fragmento, correspondiente al *cassette* SPT5, se digirió en sus extremos con la enzima *Xba*I y se subclonó en el vector pUR5750 en el mismo sitio de corte (ver Figura 12), dando lugar al plásmido pURSPT5 con un tamaño de 19.979 kb. Posteriormente, el plásmido pURSPT5 se introdujo en la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* por electroporación.

7. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

7.1. Transformación de bacterias

7.1.1. *E. coli*

7.1.1.1. Preparación de células competentes

El protocolo utilizado para la preparación de células competentes está basado en el método de Inoue y col. (1990).

1. Se realizó una siembra en estría en agar LB de *E. coli* DH5 α y se incubó a 37°C durante 16 h.
2. De esta placa inicial se inocularon 5 colonias aisladas en un matraz de 2 L con 250 mL de medio SOC y se incubó durante 20 h, aproximadamente, a 25°C y 200 rpm, hasta alcanzar una D.O. de 0,6 unidades a 600 nm.
3. El cultivo se mantuvo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 5000 x *g* durante 10 minutos a 4°C.
4. El precipitado se resuspendió en 40 mL de tampón TB frío y se mantuvo en hielo durante 10 minutos.
5. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y las células se resuspendieron en 20 mL de tampón TB frío.
6. Se añadieron 1,4 mL de DMSO (concentración final del 7%) y se mantuvo en hielo durante 10 minutos.
7. Se prepararon alícuotas, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Tampón TB: PIPES 10mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM. Se ajustó el pH a 6,7 con KOH, se añadió MnCl₂, se filtró y se conservó a 4°C.

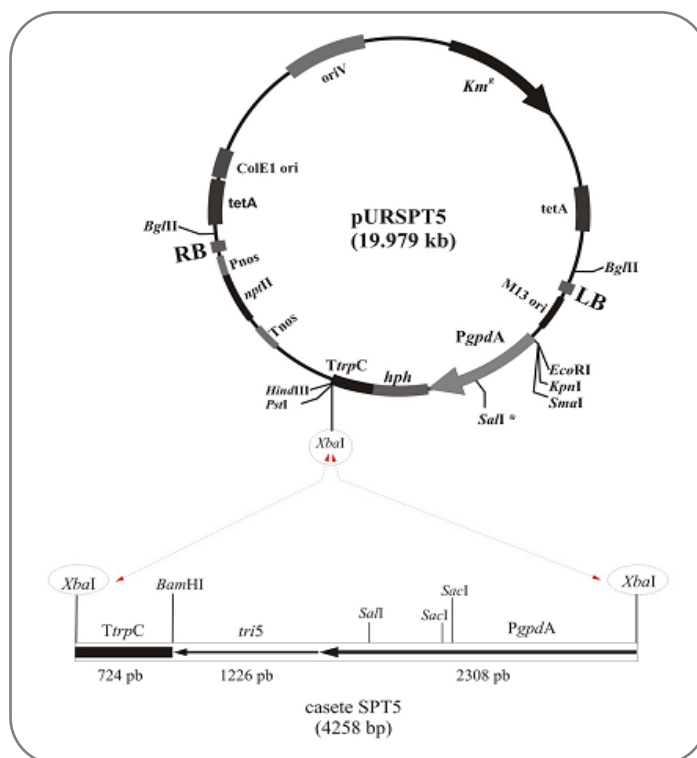


Figura 12. Esquema de la construcción del plásmido pURSPT5. Km^R : gen de resistencia a kanamicina; *hph*: gen de resistencia a higromicina; *tetA*: gen de resistencia a tetraciclina.

7.1.1.2. Transformación

La transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α se realizó mediante “choque térmico”, siguiendo el método descrito por Hanahan (1983) y modificado por Inoue y col. (1990).

1. Las células competentes se descongelaron lentamente en hielo.
2. Se incubaron en hielo 90 μ L de esas células competentes con 1-10 μ L (20-200 ng aproximadamente) del plásmido (individual o de ligación) con el que se quiera transformar durante 20 minutos.
3. Se pasaron las células a un baño de 42°C durante 45 segundos.
4. Se incubaron de nuevo en hielo durante 2 minutos.
5. Se añadió sobre las células 1 mL de medio líquido LB y se incubó a 37°C durante 1 h.
6. Se tomaron alícuotas del cultivo anterior y se extendieron sobre placas Petri con medio sólido LB. Este medio se suplementó con ampicilina (100 μ g/mL) si el plásmido era resistente a dicho antibiótico. Cuando el plásmido permitió selección por color, el medio LB se suplementó también con IPTG (25 μ M) y X-gal (50 μ g/mL).
7. Se incubaron las placas en una estufa a 37°C hasta la aparición de colonias (16-20 h).

7.1.2. *A. tumefaciens*

7.1.2.1. Preparación de células competentes

Se siguió el protocolo propuesto por Mozo y Hooykaas (1991):

1. La cepa AGL1 de *A. tumefaciens* se sembró en una placa de LB conteniendo carbenicilina (100 µg/mL) y rifampicina (50 µg/mL), y se incubó a 30°C durante dos días.
2. A partir de la placa, se inocularon 100 mL de LB con 2-3 colonias de la cepa y posteriormente el matraz se incubó toda la noche a 30°C y 250 rpm.
3. 100 mL de medio LB, contenidos en un matraz de 500 mL, se inocularon con 3 mL del cultivo anterior, y el cultivo se incubó a 30°C y 250 rpm hasta que alcanzar una D.O. de 0,5 a 600 nm de longitud de onda. Una vez obtenido el valor de D.O., el cultivo se mantuvo en hielo durante 15 minutos.
4. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 45 mL de agua estéril y se volvió a centrifugar a 3000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. Se repitió este proceso una vez más con el mismo volumen de agua estéril.
5. Después del último lavado con agua, se realizó un lavado de las células con 35 mL de glicerol al 10%. Se volvió a centrifugar a 3000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. Y el precipitado se resuspendió en 1 mL de glicerol al 10%.
6. Por último, se prepararon alícuotas de 40 µL y se congelaron con nitrógeno líquido. Las células así preparadas se almacenaron a -80°C, manteniéndose así viables durante varios meses.

7.1.2.2. Transformación

La transformación de células competentes de *A. tumefaciens* AGL1 se realizó mediante electroporación siguiendo el método de Dower y col. (1988).

1. Las células competentes se descongelaron lentamente en hielo. A 30 µL de células se añadieron 0,1-0,5 µg de plásmido y se mezcló suavemente.
2. La suspensión se añadió a cubetas de electroporación (Bio-Rad) de 0,1 cm previamente enfriadas.
3. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador (Bio-Rad) en las siguientes condiciones: 2,4 kV, 200 kΩ y 25 µF.
4. Inmediatamente después del pulso se añadió 1 mL de medio SOC y se incubaron las células a 30°C y 250 rpm durante 3 h.
5. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL). Las placas se incubaron durante 36-48 h a 30°C.

7.2. Transformación de hongos filamentosos

La transformación de *T. brevicompactum* IBT 40841 se realizó por medio de *A. tumefaciens* siguiendo el método descrito por de Groot y col. (1998) y optimizado por Cardoza y col. (2006a).

7.2.1. Preparación de *A. tumefaciens*

1. Se inoculó medio mínimo sólido (MM-Hooykaas) (Hooykaas y col., 1979) suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y carbenicilina (100 µg/mL) con *A. tumefaciens* AGL1 (lleva el vector de expresión), y se incubó durante 36-48 h a 30°C.
2. A partir de esta placa inicial, se preparó un cultivo de 100 mL de MM-Hooykaas líquido suplementado con kanamicina (50 µg/mL), y se incubó a 30°C y 250 rpm durante 24 h, hasta obtener una D.O. de 0,5-1,0 unidades a 660 nm.
3. El cultivo se separó en dos alícuotas de 50 mL y se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos, resuspendiéndose en la cantidad necesaria de medio de inducción (MI) líquido (Hooykaas y col., 1979), con o sin acetosiringona (sin AS para los controles negativos), hasta obtener una D.O. de 0,5 unidades a 660 nm. La AS es el compuesto que activa los genes de virulencia de *A. tumefaciens*.
4. La inducción se incubó a 30°C y 250 rpm durante 6 h.

7.2.2. Transformación

1. Se prepararon placas con medio de inducción (MI). Una vez secas, se colocaron filtros negros estériles de nitrocelulosa de 0,8 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Millipore) sobre la superficie de las mismas con ayuda de unas pinzas. Previamente, los filtros se humedecieron en MI líquido (con o sin AS, según corresponda), se colocaron con la cuadrícula hacia arriba y se eliminaron las burbujas.
2. Para obtener la suspensión de esporas de *Trichoderma*, se raspó una placa de PDA bien esporulada con agua estéril utilizando una pipeta de vidrio invertida. A lo obtenido se le dio un pulso de vórtex y se filtró a través de nytal. Se centrifugó el filtrado 10 minutos a 8000 rpm y 10°C, se desechó el sobrenadante y se hizo un lavado con agua estéril. Se volvió a centrifugar y se resuspendió en 1-4 mL de agua estéril (dependiendo de la cantidad de esporas obtenidas). Se guardó a 4°C hasta su uso.
3. Una vez transcurrido el tiempo de inducción en medio líquido, se mezclaron las esporas con las células de *A. tumefaciens*. Se prepararon diluciones de esporas de *T. brevicompactum* en MI con o sin AS para tener 10^6 , 10^7 y 10^8 esporas/mL. A cada una de estas diluciones se le añadió el mismo volumen de células de *A. tumefaciens* en MI con o sin AS, según correspondiera.

4. Se extendieron 100 μ L de la mezcla con un asa de vidrio sobre la superficie de la membrana con cuidado de que no se saliera de los límites de ésta. Las placas se incubaron a 18-19°C durante 48 h.
5. Pasado este tiempo, se pasaron los filtros al medio de selección con una pinza estéril. Se empleó como medio de selección TSA con higromicina y fleomicina (su concentración varía según cada cepa de *Trichoderma*) y cefotaxima (300 μ g/mL) (para eliminar las células de *A. tumefaciens*). Finalmente se incubaron las placas a 28°C el tiempo necesario para que crecieran los transformantes (4-7 días).

7.2.3. Selección de los transformantes

1. Una vez que las colonias hubieron crecido en TSA con antibiótico, se picaron con un palillo estéril y se sembraron en TSA con antibiótico pero al doble de concentración que en el paso anterior (primer pase selectivo). Se incubaron a 28°C durante 6-9 días.
2. De una en una, se pasaron a medio TSA sin antibióticos (pase no selectivo). Se incubaron a 28°C durante 6-7 días.
3. Se repitió el paso 1 (segundo pase selectivo).

8. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

8.1. Extracción de ADN

8.1.1. Extracción de ADN genómico de *Trichoderma*

8.1.1.1. Extracción a gran escala

Este protocolo se empleó para la obtención de ADN que se utilizó tanto en hibridaciones tipo *Southern* como en reacciones de PCR.

1. La extracción se realizó en tubos de 10 mL y se partió de unos 120 mg de micelio, liofilizado y pulverizado previamente. Después, se añadieron en este orden, 2,5 mL de fenol neutro, 2,5 mL de tampón de lisis y 2,5 mL de CIA [cloroformo isoamílico, 24:1 (v/v)]; los tubos se agitaron en un vórtex para homogenizar bien las muestras.
2. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 50°C, agitándolos cada 5 minutos. A continuación se centrifugaron a 1900 x g durante 20 minutos, a temperatura ambiente, y se recogió el sobrenadante (fase acuosa) en tubos limpios.
3. Se hicieron dos extracciones más con fenol-CIA (1:2 volumen de cada uno) y un paso final con un volumen de CIA. Los tubos se centrifugaron siempre a 1900 x g durante 5 minutos y a temperatura ambiente.

4. El ADN se precipitó añadiendo 1:10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 7,0 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Las muestras se mantuvieron a -20°C durante al menos 2 h.
5. Posteriormente se centrifugaron a 1900 x *g* durante 20 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante.
6. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se centrifugó a temperatura ambiente, y se retiró de nuevo el sobrenadante.
7. Finalmente, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 500 µL de tampón TE. Se añadió 1:10 del volumen de ARNasa (10 mg/mL).

Tampón de lisis: Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM; SDS al 1%. El SDS se añadió justo antes de comenzar la extracción.

8.2. Extracción de ARN de *Trichoderma*

Con el fin de reducir el riesgo de degradación de los ácidos ribonucleicos por la acción de ARNasas, todas las soluciones se prepararon con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma Aldrich) al 0,1% (v/v), durante 12 h, y posteriormente se autoclavaron. Además se empleó material de vidrio esterilizado por calor seco, lotes nuevos de puntas y tubos de plástico estériles.

8.2.1. Método del TRI Reagent®

Para llevar a cabo la extracción de ARN total se utilizó el método del TRI Reagent® (Molecular Research Center), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. Se parte de aproximadamente 30 mg de micelio de *Trichoderma* previamente pulverizado en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. El micelio se transfirió a tubos *ependorf*, a los que se añade 1 mL del reactivo TRI Reagent®.
2. Las muestras se homogenizaron por agitación en un vórtex y, posteriormente, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente.
3. A cada *ependorf* se le añadieron 0,2 mL de cloroformo, se agitaron en un vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Seguidamente, los tubos se centrifugaron a 12000 x *g* durante 15 minutos a 4°C, con el fin de eliminar los restos celulares. La fase acuosa se transfirió a un *ependorf* limpio, se le añadieron 0,5 mL de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la precipitación del ARN.
5. A continuación se centrifugó a 12000 x *g* durante 8 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol-DEPC al 75% y se centrifugó a 8000 x *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.

6. Se retiró el etanol y al precipitado, que primero se dejó secar al aire, se le añadieron 70 µL de agua destilada tratada con DEPC.
7. El ARN se incubó a 65°C durante 10 minutos para favorecer su resuspensión.
8. Finalmente, el ARN se guardó a -80°C hasta su uso.

9. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

9.1. Cuantificación y calidad de los ácidos nucleicos

9.1.1. En ensayos generales

La cantidad de ácidos nucleicos, en las preparaciones, se determinó espectrofotométricamente en un equipo GeneQuant™ pro ARN/DNA Calculador (Amersham Biosciences). El ADN se cuantificó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm, considerando que una unidad de densidad óptica equivalía a una concentración de ADN de 50 µg/mL. El ARN se cuantificó midiendo la densidad óptica a la misma longitud de onda, considerando que una unidad de densidad óptica correspondía a una concentración de ARN de 40 µg/mL.

La calidad de las preparaciones así como la bondad de las cuantificaciones realizadas, se comprobaron siempre mediante electroforesis en geles de agarosa usando marcadores de ADN de concentración conocida.

9.2. Manipulación enzimática de ácidos nucleicos

9.2.1. Tratamiento enzimático de ADN

9.2.1.1. Digestión

Las enzimas de restricción se usaron siguiendo las recomendaciones del proveedor (Roche Applied Science, Fermentas Life Science). Cada una de ellas tiene unas condiciones óptimas de digestión en cuanto a concentración de sales, temperatura y tiempo de incubación. Como norma general, el volumen de la enzima no debe superar 1:10 del volumen total de digestión debido a la alta concentración en glicerol de las soluciones de almacenamiento, condiciones que incluso podrían inhibir su propia actividad. Asimismo, es conveniente que el ADN esté lo suficientemente diluido y limpio con el fin de no alterar las condiciones de reacción.

1. Se mezclaron en un tubo: 1:10 del volumen total de digestión de tampón de digestión (10x), la cantidad adecuada de ADN resuspendido en agua o en tampón TE, las

unidades que se consideren necesarias de enzima y agua destilada estéril hasta completar el volumen de digestión.

2. La mezcla se incubó a la temperatura adecuada (normalmente 37°C) durante 3-7 h.
3. En el caso de digestiones simultáneas con dos enzimas, el tampón utilizado fue aquel en el que ambas enzimas presentaran la máxima actividad. Si las enzimas no eran compatibles, la digestión se llevó a cabo en pasos separados.

9.2.1.2. Generación de extremos romos

El relleno de extremos 5' prominentes originados por cortes con enzimas de restricción se realizó usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa (Fermentas Life Science).

1. Se resuspendió el ADN en 13 µL de agua y se añadieron 2 µL de tampón Klenow 10X.
2. Se añadió 1 µL de dNTPs 10 mM y 1 unidad de fragmento Klenow.
3. La mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos y la reacción se paró calentando a 70°C durante 10 minutos.

Tampón Klenow 10x: Tris-HCl 500mM pH 8; MgCl₂ 50mM; DTT 10mM.

9.2.1.3. Ligación

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la enzima ligasa del fago T4 (Roche Applied Science). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 10 µL conteniendo 1 µL de tampón ligasa 10x, proporcionado con la enzima, 10-40 ng de ADN vector, una cantidad equimolar de ADN inserto y 1U de ligasa T4. La ligación se incubó durante 12 h a 4°C para los fragmentos con extremos cohesivos y a 16°C para los fragmentos con extremos romos.

Tampón de ligación Roche Applied Science 10X: Tris-HCl 660mM, pH 7,5; MgCl₂ 50 mM; DTT 50mM; ATP 10 mM.

9.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

9.3.1. Reacción clásica

Las reacciones de PCR convencionales se realizaron empleando *Taq* polimerasa (Biotools). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 µL conteniendo el ADN molde, 5 µL de tampón de PCR 10x, proporcionado con la enzima, 2 mM de MgCl₂, 400 µM de dNTPs, 1 µM de cada oligonucleótido y 2,5 U de *Taq* polimerasa.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos que incluían: 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 1 minuto a la temperatura establecida empíricamente para cada par de oligonucleótidos

(hibridación), y finalmente un tiempo aproximado de 1 minuto por cada kilobase a amplificar a 72°C (extensión). Tras esos 35 ciclos la amplificación se completó con una extensión final a 72°C durante 7 minutos.

9.3.2. RT-PCR

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit “*Reverse transcription System*” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. En un tubo de microcentrífuga se mezclaron, en el orden siguiente: 10 µL de la mezcla maestra (2x), 3 µL de oligo dT y 1 µL de enzima.
2. Se añadieron 3 µg de ARN y se completó a un volumen final de reacción de 20 µL con ARNasa-free H₂O.
3. La mezcla se incubó 5 minutos a 25°C (anillamiento), 15 minutos a 42°C (síntesis del ADNc) y 5 minutos a 95°C, para completar la reacción.
4. El tubo de reacción se guardó a -20°C hasta su uso.

9.3.3. PCR a tiempo real (*Real-time PCR*)

El principio de esta técnica consiste en la detección de los productos de PCR mediante la utilización de SYBR Green I, el cual emite fluorescencia al unirse a las moléculas de ADN de doble cadena durante la amplificación. Una posterior medida de la intensidad de la fluorescencia emitida nos permite determinar la cantidad de producto de PCR amplificado en una muestra.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL a la concentración final que se indica:

12,5 µL Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix (2x) (Stratagene)
0,3 µL oligo *forward* (concentración final 150 nM)
0,3 µL oligo *reverse* (concentración final 150 nM)
0,375 µL *diluted reference dye* (concentración final 30 nM)
10,53 µL H₂O desionizada
1 µL ADNc (4 ng) como molde de reacción

Las amplificaciones se realizaron, en triplicado, en un ABI Prism® 7000 que se programó con las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 1 minuto a 60°C (anillamiento) y 1,5 minutos a 72°C (extensión). Cuando los productos a amplificar eran de un tamaño mayor a 400 pb se añadió 1 ciclo de 3 minutos a 72°C. Se realizó una medida continua de la fluorescencia emitida

en un rango de 60-95°C aumentando la temperatura 0,2°C por segundo. Finalmente las muestras se mantuvieron a 4°C.

Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de *Real-time* PCR fueron analizados previamente mediante una curva de disociación para determinar posibles productos inespecíficos como la formación de dímeros.

Para calcular la expresión genética relativa, se utilizó el modelo $2^{-\Delta\Delta CT}$, que parte del supuesto de que la eficiencia con la que se amplifica el gen problema y el gen de referencia es óptima e idéntica (correspondiente al 100%) (Livak y Schmittgen, 2001).

Se validó el uso de la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001) mediante la realización de una curva de eficiencia de amplificación para cada uno de los oligonucleótidos utilizados, tal y como se muestra a continuación:

$$y = mx + b$$

$$E = 10^{-1/m}$$

y= variable dependiente

m = pendiente de la recta

x= variable independiente

b= corte en el eje y

E= eficiencia

Para esta ecuación, la pendiente (m) debe tener un valor aproximado entre -3,2 y -3,5 (siendo ideal un valor de -3,32), lo cual indica una eficiencia de amplificación cercana al 95-100%. El valor de la eficiencia (E) debe ser cercano a 2, o idealmente igual a 2, indicando una eficiencia de amplificación cercana al 100% o del 100%, respectivamente.

De esta forma, $2^{-\Delta\Delta CT}$ expresa la diferencias entre los valores Ct de la muestra y del control, tal y como se muestra a continuación:

$$\text{Ratio} = 2^{[\Delta CT \text{ muestra} - \Delta CT \text{ control}]}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta\Delta CT]}$$

9.3.4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por las casas comerciales Isogen Life Science, Thermo Fisher Scientific o Sigma Aldrich, y se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos usados en este trabajo (indicados de 5' a 3').

Nombre	Secuencia	Utilidad
tri5-F	GGCATGTGTGTTTACTCTTGG	Screening de minigenoteca
tri5-R	ACCATCCAGTTCTCCATCTG	Screening de minigenoteca
Tri5Tb-5	ATGGTTGAGCTCAACGACGTC	Aislamiento del gen <i>Tbtri5</i> /Obtención sonda
Tri5Tb-3b	CTACTGGGCGACGGAGGAGAT	Aislamiento del gen <i>Tbtri5</i>
pAN52-gpdA	TTTTTCTAGACCTTGATCTCTACACA	Sacar el <i>cassette</i> SPT5
pAN52-trpC	AGTGGAGATGTGGAGTGGG	Sacar el <i>cassette</i> SPT5
Ble	CCTTTTCAGTTCGAGCTTTCCC	Comprobación construcción pURSPT5
erg1-f	CGCTCCGTGCTTCTTCTC	Expresión del gen <i>erg1</i>
erg1-r	CTTCTTCTCTCCCGTCTCC	Expresión del gen <i>erg1</i>
erg7-f	CTCTCTTCCACAAGCACT	Expresión del gen <i>erg7</i>
erg7-r	ATACTCTGCCACCAGGAG	Expresión del gen <i>erg7</i>
pUR-F	CCGGCGACAGCGATGC	Comprobación T-ADN en la transformación
pUR-R	CTCTGACTTGAGCGTCG	Comprobación T-ADN en la transformación
RB-F	GAATCGGCCAACGCGCG	Comprobación T-ADN en la transformación
RB-R	CATGTAATGCATGACG	Comprobación T-ADN en la transformación
tri5-3	CCCAGACCATTGATACGGC	Obtención sonda
tri3-f	CATTGAGCCACCTAACCTAACCG	Expresión del gen <i>tri3</i>
tri3-r	CCATCCTTCAACCACCGTCGGC	Expresión del gen <i>tri3</i>
tri4-f	CTTGATGGAGCCTTCTCAGC	Expresión del gen <i>tri4</i>
tri4-r	CATCAAGATAGTCCTTATGTTT	Expresión del gen <i>tri4</i>
tri6-f	CGTGCTGACGTGGTTCGAGTGC	Expresión del gen <i>tri6</i>
tri6-r	CTATGGAATGGGTCGGCGAATC	Expresión del gen <i>tri6</i>
tri10-f	CGCTCTCATATGAGTACGTTGGC	Expresión del gen <i>tri10</i>
tri10-r	CCATGAATGGTGAAGATGGGC	Expresión del gen <i>tri10</i>
tri11-f	CGCGAGTACGCTTATTACCG	Expresión del gen <i>tri11</i>
tri11-r	GCAGAGCGCACTTCTTCAGTC	Expresión del gen <i>tri11</i>
tri12-f	GTTCCATATCTTCCGCCATATTC	Expresión del gen <i>tri12</i>
tri12-r	GCGATTGACAGAAGCCATTGC	Expresión del gen <i>tri12</i>
tri14-f	GCTGATGCTGAGCTTGCAAGTG	Expresión del gen <i>tri14</i>
tri14-r	GCCAAGAGGCTCTTGACGAAG	Expresión del gen <i>tri14</i>
Tri14 F	GATAGTGCTCTGTAGCATG	Disposición genes <i>tri14-tri12</i>
Tri12 R	CACTTCATCCGAGCACCC	Disposición genes <i>tri14-tri12</i>
Tri12 F	CAGCCGCTGTTACTGTTTCAG	Disposición genes <i>tri12-tri11</i>
Tri11 R	CACCGAAATAGCGTTGGCC	Disposición genes <i>tri12-tri11</i>
Tri11 F	CAAATTACATGATCGATTTCGC	Disposición genes <i>tri11-tri10</i>
Tri10 R	CCTCCAATGCTGCTGATGTAG	Disposición genes <i>tri11-tri10</i>
Tri10 F	GCGTTCGCTTGGGTAGGATC	Disposición genes <i>tri10-tri3</i>
Tri3 R	CAAGTTTCTCAAATGTGTGGC	Disposición genes <i>tri10-tri3</i>
Tri3 F	GTTCCGGAAGTTTGCTACCC	Disposición genes <i>tri3-tri4</i>
Tri4 R	GTGAAGGTATCAAGAAGC	Disposición genes <i>tri3-tri4</i>
Tri4 F	CCTTCAGCGCTTGATGTC	Disposición genes <i>tri4-tri6</i>
Tri 6 R	GATGATAGCGAGACTCCTG	Disposición genes <i>tri4-tri6</i>
Tri 14-F	GCAACCACAGGTGTTACTG	Comprobación tamaño del gen <i>tri14</i>
Tri 14-R	CATGCTACAAGAGCATCTAC	Comprobación tamaño del gen <i>tri14</i>
Tri 12-F	GGGTGCTCCGGATGAAG	Comprobación tamaño del gen <i>tri12</i>
Tri 12-R	CTGAAACAGTAACAGCGGC	Comprobación tamaño del gen <i>tri12</i>

Tri 11-F	ATGGCCAACGCTATTTCTGGTG	Comprobación tamaño del gen <i>tri11</i>
Tri 11-R	GCGAATCGATCATGTAATTTG	Comprobación tamaño del gen <i>tri11</i>
Tri 10-F	CATCAGCAGCATTGGAGGGC	Comprobación tamaño del gen <i>tri10</i>
Tri 10-R	GATCCTACCCAAGCGAACGC	Comprobación tamaño del gen <i>tri10</i>
Tri 3- F	GAGAAGATTAGCATATATTTAG	Comprobación tamaño del gen <i>tri3</i>
Tri3-R	GTAGCAAACCTCCGGAAC	Comprobación tamaño del gen <i>tri3</i>
Tri 4-F	GCTTCTTGATGACCTTCAC	Comprobación tamaño del gen <i>tri4</i>
Tri 4-R	GACATCAACGCGCTGAAGG	Comprobación tamaño del gen <i>tri4</i>
Tri 6-F	GAATGATGATAGCGAGACTC	Comprobación tamaño del gen <i>tri6</i>
Tri 6-R	CTTCCCATGAATTCGTCG	Comprobación tamaño del gen <i>tri6</i>
T-tub-f	GAATATCAACAATACCAGGATGG	Utilizado como gen endógeno
T-tub-r	AGGATTGGTATTGATCATCAGCA	Utilizado como gen endógeno

9.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

9.4.1. Electroforesis de ADN

Los fragmentos de ADN se separaron según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa, a una concentración variable del 0,8-1,2% (p/v), dependiendo del tamaño del ADN que se deseaba separar.

1. Se añadió la cantidad adecuada de agarosa al volumen necesario de tampón TAE 1x y se fundió por ebullición en un microondas.
2. Se dejó enfriar hasta 55-60°C y se añadió bromuro de etidio hasta una concentración final aproximada de 1 µg/mL.
3. Se vertió el gel en la bandeja de electroforesis y se dejó que solidificara.
4. Se prepararon las muestras añadiendo tampón de carga 6x.
5. Se llevó a cabo la electroforesis en tampón TAE 1x aplicando un voltaje aproximado de 5 V por cm de longitud de la cubeta, y se incluyeron, en el gel, marcadores de ADN de pesos moleculares conocidos.
6. Se visualizaron las bandas mediante iluminación con luz ultravioleta, y se fotografió el gel si procedía.

Tampón TAE 50x: Tris-acetato 2 M, pH 8,0; EDTA 50 mM. Se pesaron 242 g de Tris, se añadieron 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0.

Tampón de carga 6x: sacarosa al 40% (p/v); azul de bromofenol al 0,25% (p/v); xileno cianol FF al 0,25% (p/v).

9.4.2. Electroforesis de ARN

Para las electroforesis de muestras de ARN los tampones se prepararon en agua tratada con DEPC. El resto del material necesario (cubetas, peines, bandejas) se mantuvo en agua con

3% H₂O₂ durante al menos 30 minutos y, posteriormente, se lavó con agua destilada tratada con DEPC.

9.4.2.1. En condiciones no desnaturizantes (geles de agarosa)

Para comprobar la calidad de las extracciones de ARN, se hizo una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, tal y como se indica en el apartado 9.4.1 para muestras de ADN. Se consideró que el ARN extraído era de calidad cuando pudieron apreciarse clara y nítidamente las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 18 y 28S.

9.5. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de interés se cortaron del gel de agarosa con ayuda de un bisturí y se purificaron con el kit “Geneclean® II” (Qbiogene) siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.6. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del Servicio de Secuenciación automática de la Universidad de Salamanca. Para productos de PCR, se utilizaron 100 ng de ADN por cada kb de longitud del producto y 3 pmoles del oligonucleótido de interés, en un volumen final de reacción de 8 µL.

10. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN EN MEMBRANA

10.1. Transferencia de ADN de geles de agarosa (Southern blot)

Se realizaron digestiones de aproximadamente 10 µg de ADN genómico tal como se describe en el apartado 8.1.1.1. Los fragmentos originados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, conteniendo bromuro de etidio, aplicando un voltaje bajo (2 V por cm de longitud de la cubeta). Una vez fotografiado, el gel se sometió al siguiente protocolo:

1. Se trató con HCl 0,25 N durante 15 minutos en agitación moderada, con el fin de fragmentar las moléculas de ADN mayores de 10 kb. A continuación, se lavó varias veces con agua destilada.
2. Se sumergió el gel en la solución de desnaturización durante 45 minutos, en agitación moderada. Se lavó posteriormente con agua destilada.
3. Se sumergió en la solución de neutralización durante 45 minutos a temperatura ambiente, también en agitación.
4. Posteriormente, el gel se equilibró en tampón SSC 10x durante 45 minutos, en agitación.

5. La transferencia se llevó a cabo por capilaridad desde el gel a una membrana de nylon, cargada positivamente, HybondTM N⁺ (Amersham Biosciences). Para ello, el gel se situó sobre un puente de papel de filtro Whatman[®] 3 MM que está en contacto con el tanque de tampón SSC 10x y saturado con el mismo. Sobre el gel, se colocaron sucesivamente la membrana de nylon del tamaño del gel, 2 papeles Whatman[®] 3 MM, una pila de papel absorbente y finalmente, un peso aproximado de 0,5 kg. Es importante la eliminación de las burbujas de aire que se pueden formar al superponer las distintas capas. La transferencia por capilaridad así dispuesta se mantuvo, al menos durante 12 h.
6. Tras la transferencia, la membrana se pasó a SSC 2x durante 2 minutos. Se dejó secar al aire y se irradió con luz UV en un *Stratalinker* (Stratagene) aplicando 120 mJ 30 segundos para fijar los ácidos nucleicos a la misma.

Solución de desnaturalización: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M

Solución de neutralización: NaCl 3 M; Tris-HCl 0,5 M; pH 7,5

SSC 20x: NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M. Se ajusta a pH 7,0 con NaOH

10.2. Marcaje no radiactivo de ADN

Para este marcaje se utilizan dCTPs con digoxigenina unida. Para incorporar estos dCTPs, se utilizó una reacción de PCR y se incluyó, en la mezcla de reacción, 1:10 del volumen de nucleótidos marcados del kit "*PCR Dig Labeling Mix*" (Roche Applied Science).

El producto de la reacción de marcaje no radiactivo fue sometido a electroforesis en gel de agarosa y purificado a partir del gel, empleando el método indicado en el apartado 9.4.1.

10.3. Prehibridación, hibridación y lavados

10.3.1. Prehibridación

La prehibridación tiene como finalidad, además de equilibrar la membrana con el tampón de hibridación, bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido los ácidos nucleicos transferidos y que pueden unir inespecíficamente los fragmentos de ADN usados como sonda. En todos los casos, se llevó a cabo una prehibridación en el tampón de hibridación correspondiente durante un mínimo de 60 minutos. El volumen del tampón añadido no debe superar los 100 μ L por cm^2 de membrana.

10.3.2. Hibridación y lavados

La especificidad de la hibridación depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura, concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de los lavados posteriores.

10.3.2.1. Hibridación con sondas no radiactivas

La hibridación se realizó a 65°C durante, al menos, 12 h en el tampón de hibridación correspondiente, al que se le añadió la sonda desnaturalizada. La desnaturalización de la sonda se realizó por calentamiento durante 10 minutos a 100°C y, posteriormente, enfriando en hielo durante, al menos, 2 minutos.

Seguidamente, se retiró el tampón de hibridación con la sonda (se puede guardar a -20°C para ser reutilizado). La membrana se sometió a dos lavados con SSC 2x y SDS al 0,1% durante 15 minutos, el primero a temperatura ambiente y el segundo a 65°C. A continuación, se realizó un lavado más con SSC 0,2x y SDS al 0,1% durante 15 minutos a 65°C.

Tampón de hibridación para sondas no radiactivas: Para preparar 200 mL, se añadieron en este orden 148 mL de agua, 0,4 mL de SDS al 10%, 2 mL de sarcosina al 10% (p/v) y 50 mL de SSC 20x. Se mantuvo la mezcla durante 5-10 minutos a 65°C y se añadieron después 2 g de “*Blocking Reagent*” (Roche Applied Science). Se calentó y agitó la mezcla durante 30-45 minutos a 65°C y, posteriormente, se dejó enfriar.

10.4. Detección

10.4.1. No radiactiva

La detección no radiactiva se realizó con anticuerpos frente a digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina. El revelado de la actividad fosfatasa se llevó a cabo mediante una reacción quimioluminiscente, empleando el reactivo “*CDP-Star*” (Roche Applied Science). Para ello, se siguió, con algunas modificaciones, el siguiente protocolo proporcionado por la casa comercial:

1. Tras los lavados (apartado 10.3.2.1), se trató la membrana con tampón de lavado (*washing buffer*) a temperatura ambiente durante 5 minutos.
2. Se añadió sobre la membrana la solución de bloqueo y se inoculó en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.
3. Se añadió a la solución anterior el anticuerpo “*AntiDIG-AP Fab fragments*” (Roche Applied Science), 1:20000 veces diluido, y se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.
4. Se hicieron dos lavados de 15 minutos con tampón de lavado.
5. Se añadió el tampón de detección durante 3-5 minutos para equilibrar la membrana.
6. Se retiró el tampón y se añadió el reactivo “*CDP-Star*” (Roche Applied Science), diluido 1:100 en tampón de detección, sobre la membrana y se cubrió la misma con papel de plástico transparente para facilitar la distribución del reactivo por toda la superficie de la membrana. Se incubó 5 minutos en oscuridad.
7. Finalmente, las membranas fueron colocadas en un sistema de captura químico-luminiscentes FUJIFILM LAS-1000.

Tampón maleico: NaCl 150 mM; ácido maleico 100 mM, pH 7,5

Tampón de lavado: Tween 20 al 0,3% (v/v) en tampón maleico

Solución de bloqueo: *Blocking Reagent* al 1% (p/v) en tampón maleico

Tampón de detección: Tris-HCl 100mM, pH 9,5; NaCl 100 mM

10.5. Reutilización de membranas (Hibridación no radioactiva)

Las membranas se sometieron al siguiente tratamiento para su reutilización:

1. Inicialmente se sumergieron en agua destilada estéril y seguidamente se realizaron dos lavados de 15 minutos con una solución de NaOH 0,2 N y SDS al 0,1%.
2. Finalmente se mantuvieron durante, al menos, 10 minutos en SSC 2x y se guardaron en SSC 2x hasta su reutilización.

11. AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

11.1. Preparación de cultivos de fermentación

Cada una de las cepas de *Trichoderma* objeto de este estudio (la cepa silvestre *T. brevicompactum* IBT 40841 y el transformante Tb41tri5 que sobreexpresa el gen *Tbtri5*) se creció en medio PDB. Para ello, se inocularon 500 mL de medio con 10^6 esporas/mL del hongo, y los cultivos se incubaron a 28°C y 220 rpm, durante 14 días, en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, los medios de fermentación se filtraron, con ayuda de una bomba de vacío, a través de filtros de papel estériles para eliminar el micelio. Y, los sobrenadantes se saturaron con acetona al 100% en una proporción 1:1 (v/v).

11.2. Aislamiento de metabolitos

Esta parte de la tesis se realizó en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Cádiz.

11.2.1. Extracción orgánica

Los extractos acetónicos se concentraron al vacío en un rotavapor, eliminando la acetona. El medio acuoso se sometió a extracción líquido-líquido con acetato de etilo, repitiéndose la extracción tres veces. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4) y se concentró a sequedad. A continuación, se evaporó el disolvente orgánico, a presión reducida y baja temperatura, en un rotavapor, obteniéndose un aceite denso que constituyó el crudo de la fermentación.

11.2.2. Cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF se utilizó como técnica de estudio inicial de los crudos de fermentación, así como para la elección de las polaridades de los eluyentes utilizados en otras técnicas cromatográficas.

Se utilizaron cromatofolios de gel de sílice, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), con un espesor de 0,25 mm e indicador fluorescente. Todas las mezclas se disolvieron en acetona; y como eluyente se emplearon mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad creciente.

Las cromatografías se resolvieron por exposición a luz UV ($\lambda=254$ ó 360 nm) y revelado. Se utilizaron diferentes tipos de reveladores, olivum, ácido fosfomolibdico y solución de vainillina al 1% en etanol, acidificada con ácido sulfúrico concentrado. La aplicación sobre la cromatopla ca se realizó mediante pulverización. Un posterior calentamiento de la placa a 100°C permitió observar las manchas de los productos.

12.2.3. Cromatografía en columna (CC)

Los crudos de fermentación se percolaron mediante cromatografía en una columna de dimensiones 1,5 x 20 cm. Para ello se usó gel de sílice SDS de grano 60-200 μm , compactada con el gel seco. Las mezclas a separar se introdujeron disueltas en el mismo eluyente, o bien como cabezas sólidas sobre el propio gel de sílice SDS de grano 60-200 μm . Las cromatografías se llevaron a cabo a presión atmosférica o con sobrepresión de aire en el rango de 0,1 a 0,5 bares. La elución se realizó con fases móviles de polaridad creciente, usando como eluyentes mezclas de acetato de etilo/hexano de polaridad creciente, 5% a 100% en acetato, y finalmente con metanol.

12.2.4. Cromatografía en placa preparativa (CP)

Se utilizaron cromatopla cas preparativas de gel de sílice, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), de dimensiones 20 x 20 cm con un espesor de 0,5 mm e indicador fluorescente. Como eluyente se empleó una mezcla de hexano/acetato de etilo al 50%. Las cromatografías se resolvieron por exposición a luz UV (254 y 360 nm).

11.2.5. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Merck-Hitachi LaChrom, equipado con índice de refracción IR-71, bomba L-6200 A e integrador D-2500, haciendo uso del programa *Borwin* v.1.21. Las separaciones se llevaron a cabo sobre una columna de sílica LiChrospher Si-60 con

relleno de 10 μm y dimensiones de 1 x 25 cm (semipreparativa), o con relleno de 5 μm y dimensiones de 0,4 x 25cm (analítica), con un flujo de 1,0 mL/minuto.

La preparación de las muestras, previa a su introducción en el equipo de HPLC, se realizó en una pequeña columna de gel de sílice de dimensiones 0,6 x 7 cm, para eliminar la línea base y, a continuación, se filtraron a través de filtros de poros de tamaño 0,45 μm (Teknokroma). Se emplearon como eluyentes hexano, acetato de etilo y mezclas de los mismos, previamente destilados y filtrados por filtros de tamaño de poro 0,45 μm (Millipore).

11.2.6. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros se registraron en el equipo Varian Gemini-300 y Varian Innova-400 a 25°C. Las muestras se disolvieron en cloroformo o metanol deuterados.

Los desplazamientos químicos se expresan en la escala δ en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). Los valores de δ están referenciados al pico residual de cloroformo (7,25 ppm para RMN- ^1H y 77,0 ppm para RMN- ^{13}C) y de metanol (3,30 y 4,84 ppm para RMN- ^1H).

La multiplicidad de las señales se indica con las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), m (multiplete), dd (doblete de doblete), dt (doblete de triplete), ddd (doblete de doblete de doblete), etc. Los multipletes se definen con el valor de δ de su punto medio, o bien como un intervalo de los valores de δ .

Se emplearon las siguientes técnicas de RMN:

- RMN- ^1H .
- RMN- ^{13}C : se realizaron espectros de desacoplamiento en banda ancha.

12. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

12.1. Bioensayo frente a *S. cerevisiae* CECT 1383 y *K. marxianus* CECT 1018

En este ensayo, que es una modificación del descrito por Binder (1999), se incluyeron la cepa silvestre de *T. brevicompactum* IBT 40841 y 10 transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, con objeto de escrutar la actividad antilevadura de todos ellos y seleccionar transformantes para ser incluidos en estudios posteriores. Se utilizaron filtrados fúngicos procedentes de cultivos incubados en medio PDB, durante 14 días a 220 rpm, en oscuridad. En

este ensayo se incluyeron filtrados de cultivos de *S. cerevisiae* CECT 1383 y *K. marxianus* CECT 1018, como controles de crecimiento, y medio PDB, como control negativo.

A continuación se describe el ensayo utilizado:

1. Se sembraron *S. cerevisiae* CECT 1383 y *K. marxianus* CECT 1018 en placas de LM y de YPG-50, respectivamente, y se incubaron a 30°C durante 2 días.
2. De cada cultivo sólido, se seleccionaron de 2-3 colonias que se inocularon en 50 mL de los medios LM y YPG-50, respectivamente. El cultivo de *S. cerevisiae* se incubó durante 20 h a 30°C y 250 rpm, y el de *K. marxianus* a 35°C durante 16 h y 200 rpm; hasta alcanzar una D.O. entre 0,9-1 a 600 nm y 560 nm, respectivamente.
3. Seguidamente 100 mL de los medios LM (1% agar) y YPG-50 (1% agar) se inocularon con 200 µL de los cultivos anteriores, cada uno con el que correspondía, y se utilizaron para preparar placas que contenían 20 mL de estos medios.
4. Una vez solidificados los medios, se colocaron arandelas metálicas sobre la superficie y se depositaron, en ellas, 60 ó 90 µL de los filtrados a ensayar.
5. Las placas se mantuvieron durante 4-6 h a 4°C para permitir que difundieran los filtrados y, posteriormente, se incubaron a 28°C durante 12-24 h.
6. Transcurrido ese tiempo, se midieron, en mm, los halos de inhibición formados.

12.2. Actividad antimicrobiana de extractos acetónicos de *T. brevicompactum*

Se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana en medio sólido y medio líquido según protocolos estandarizados por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Se incluyó un panel de cepas de la colección de MSD que contiene patógenos de importancia en clínica humana y cepas de control de laboratorio (ver apartados 1.1, 1.2 y 1.2.3).

12.2.1. Preparación de extractos acetónicos

Se obtuvieron extractos acetónicos de *T. brevicompactum* IBT40841 y los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, como se detalla a continuación:

1. Se inocularon 50 mL de los medios de cultivo PDB y CYS80 con 10^6 esporas/mL del hongo, y se incubaron a 28°C y 220 rpm, durante 14 días, en oscuridad.
2. Transcurrido ese tiempo, los medios de fermentación se filtraron, con ayuda de una bomba de vacío, a través de filtros de papel estériles para eliminar el micelio y 20 mL del filtrado se mezclaron con acetona 100% en proporción 1:1 (v/v).
3. Los 40 mL de mezcla se mantuvieron en agitación a 22°C y 220 rpm, durante 45 minutos, en una atmósfera de 80% de humedad con el fin de homogenizar la mezcla.

4. El extracto acetónico se separó mediante centrifugación a 1500 x g, durante 15 minutos y a temperatura ambiente, en tubos de vidrio.
5. Se depositaron 2 mL de extracto acetónico y 100 µL de DMSO puro en pocillos de 2,5 mL de placas *microtiter* de 96. Los extractos se evaporaron a la cuarta parte de su volumen mediante centrifugación al vacío (GENELAC-EZ2), con el fin de incrementar la concentración de metabolitos y reducir los efectos tóxicos del solvente. Los extractos, así obtenidos, se conservaron a 4°C hasta su uso.

12.2.2. Ensayos con extractos acetónicos en medio sólido

Para evaluar la actividad de los extractos acetónicos de *Trichoderma* en un medio sólido se utilizó el siguiente protocolo:

1. Inicialmente, los microorganismos diana se crecieron, en su medio correspondiente, durante 24 h a 37°C, excepto la levadura *C. albicans* MY 1055 que se incubó a 30°C.
2. Microorganismos del cultivo anterior se utilizaron para inocular 250 mL de un medio adecuado, que se incubó hasta alcanzar una D.O. de 0,22 unidades a 660 nm.
3. Posteriormente, el cultivo se diluyó 1:30 veces y se dispensó en placas a razón de 20 mL por cada una de ellas. En el caso de *A. fumigatus* MB 5668 y *B. subtilis* MB 964, las placas se prepararon añadiendo a 250 mL de los medios Bacto agar y agar nutritivo con extracto levadura, respectivamente, 100 µL de una suspensión comercial (Difco Becton Dickinson) de esporas previamente sonicadas. Con objeto de generar los pocillos en el medio, las placas se cerraron con tapas que contienen pinchos y éstas se mantuvieron hasta que el medio solidificara, sustituyéndolas por tapas convencional una vez que eso ocurre.
4. Los medios se inoculan con 5 (para Gram negativos) ó 10 µL (para Gram positivos, levaduras y hongos) de extracto acetónico por pocillo y se incuban a 37°C, excepto para *A. fumigatus* MB 5668 y *C. albicans* MY 1055 que se utilizan 30°C, durante 18-24 h.
5. Transcurrido ese tiempo, se midieron, en mm, los diámetros de los halos de inhibición formados.

Para cada microorganismo diana se incluyeron controles positivos y negativos, pocillos que contenían concentraciones adecuadas de un antibiótico (Tabla 2, apartados 1.2 y 1.3.3).

12.2.3. Ensayos con extractos acetónicos en medio líquido

Para evaluar la actividad de los extractos acetónicos de *Trichoderma* en un medio líquido se utilizó el siguiente protocolo:

1. Inicialmente, los microorganismos diana se crecieron, en su medio correspondiente, durante 24 h a 37°C.
2. Microorganismos del cultivo anterior se utilizaron para inocular 250 mL de un medio adecuado, que se incubó hasta alcanzar una D.O. entre 0,250-0,300 unidades a 600 nm.
3. Para preparar diluciones, del cultivo anterior, 1 mL se añadió a 100 mL de un medio adecuado.
4. El medio contenido en los pocillos de las microplacas fue el resultado de añadir, a cada pocillo, 90 µL de la dilución del microorganismo, 5 µL de un medio adecuado y 5 (Gram negativos) ó 10 µL (Gram positivos) de extracto acetónico.
5. Las microplacas se agitaron 2 minutos y se realizaron dos lecturas a 612 nm, una lectura inicial (T_0) y otra a las 24 h (T_f) de incubación bajo condiciones recogidas en el apartado anterior, en un Multi-Detection Microplate Reader Ultra Evolution™ (TECAN).
6. Se calculó el porcentaje de inhibición (100-X) mediante la fórmula:

$$X = \frac{T_f \text{ problema} - T_0 \text{ problema}}{T_f \text{ control} - T_0 \text{ control}} \times 100$$

$$100 - X = \% \text{ de inhibición}$$

X= porcentaje de crecimiento

T_f = lectura final

T_0 = lectura inicial

control= crecimiento del microorganismo diana en ausencia de extracto acetónico

problema= crecimiento del microorganismo diana en presencia de extracto acetónico

En las microplacas se incluyeron controles de esterilidad del medio (pocillos conteniendo 95 µL de medio adecuado y 5 ó 10 µL de DMSO 20%), controles de crecimiento del microorganismo (pocillos conteniendo 90 µL de la dilución del microorganismo, 5 µL de medio y 5 ó 10 µL de DMSO 20%), y una curva control de antibiótico que varió según el microorganismo diana evaluado en cada caso (Tabla 2).

12.2.4. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para los extractos acetónicos de las cepas de *Trichoderma* que presentaron actividad en ensayos en medio líquido, se determinó la CMI (mínima concentración de extracto acetónico capaz de inhibir el 99,9% del microorganismo diana). Para ello, se prepararon cinco diluciones seriadas de los extractos con DMSO 20%, obteniéndose un rango de concentraciones desde 2 hasta 0,125x, en un Multidrop Combi_01 (Thermo Fisher Scientific) y un MicroMix5 (Beckman Coulter). Para realizar esta determinación se siguió el procedimiento detallado en el apartado 12.2.3.

12.3. Actividad antimicrobiana de fracciones puras de *T. brevicompactum*

Este ensayo, que es una modificación del descrito por Bauer y col (1966), se utilizó para evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos purificados por HPLC, a partir de extractos acetónicos. En este ensayo se incluyeron los aislamientos clínicos bacterianos recogidos en el apartado 1.1, las tres especies de *Candida* pertenecientes a la colección de MSD (ver apartado 1.2) y la cepa *A. fumigatus* MF 5668 (MSD) especificada en el apartado 1.3.3.

Inicialmente, se prepararon soluciones de trichodermina e hidroxitirosol a 8, 4, 1 y 0,1 mg/mL, y de tirosol a 6, 4, 1 y 0,1 mg/mL. Y, su actividad antimicrobiana, se evaluó con el siguiente protocolo:

1. Se creció el microorganismo diana en un medio sólido adecuado durante 12 h a 35°C.
2. Se utilizó un hisopo estéril para tomar, de la placa de cultivo, colonias aisladas de igual morfología que se resuspendieron en 4 mL de solución salina estéril 0,85%.
3. Se ajustó la turbidez del inóculo utilizando una tarjeta *Wickerham* (Figura 14) hasta obtener un valor homogéneamente comparable con el estándar 0,5 de Mc Farland.
4. Se utilizó un hisopo para tomar una muestra de la suspensión microbiana previamente preparada e inocular toda la superficie de una placa de agar Mueller Hinton (en el caso de las bacterias) y Bacto agar (en el caso de las levaduras y el hongo).
5. Sobre la superficie de cada medio de cultivo, se colocaron aros metálicos y se inocularon con 60 ó 90 µL de las diferentes concentraciones de las fracciones puras que se dejaron difundir durante 4-6 h a 4°C. Las placas se incubaron a 28°C durante 12-24 h.
6. Transcurrido ese tiempo, se midieron, en mm, los diámetros de los halos de inhibición formados.

Estándar 0,5 McFarland: suspensión preparada a partir de una mezcla de cloruro de bario 1% y ácido sulfúrico 1%, cuya turbidez es igual a la que presenta una suspensión bacteriana de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

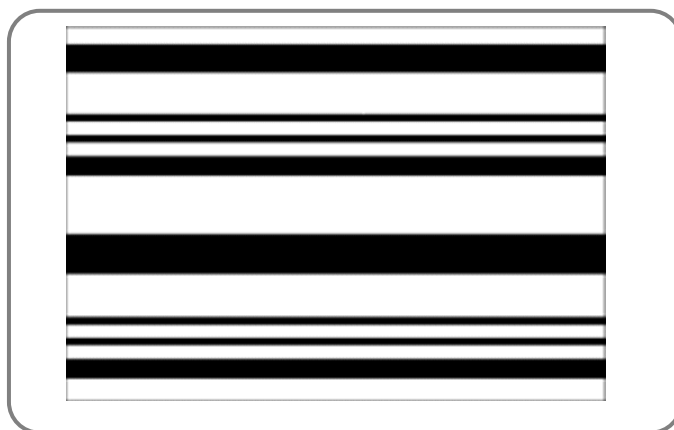


Figura 13. Tarjeta *Wickerham*: consiste en una plantilla blanca con líneas negras, que se utiliza para realizar comparación visual de la turbidez de una suspensión con las escalas de los estándares de Mc Farland.

13. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y CITOTÓXICA FRENTE A LÍNEAS CELULARES

13.1. Preparación de las líneas celulares

Para analizar si los extractos acetónicos de *T. brevicompactum* tenían actividad antitumoral, se realizaron ensayos con diferentes líneas de células tumorales humanas de la colección ATCC (apartado 1.4).

Inicialmente, se prepararon 10 diluciones seriadas de los extractos acetónicos, obtenidos según se describe en el apartado 12.2.1, con DMSO 20% para alcanzar un rango de concentraciones desde 0,0039x hasta 2x.

Después, se prepararon las líneas celulares utilizando el siguiente protocolo:

1. A partir de cultivos celulares propagados y siguiendo las recomendaciones de la ATCC, se realizó un subcultivo celular en monocapa en el medio adecuado (apartado 3.3).
2. Con objeto de extraer la monocapa celular del frasco de cultivo, y eliminar las trazas de suero fetal bovino, se retiró el medio de cultivo y se hicieron dos lavados con el tampón PBS 1x; y las células se incubaron durante 10-15 minutos a 37°C, en atmósfera aerobia y 5% de CO₂, en 4 mL de una solución de tripsina 0,25% - EDTA 0,53 mM.
3. También se añadieron 10-20 mL del medio de crecimiento, que varió según la línea celular. El cultivo celular se transfirió a un tubo cónico que se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante.
4. El precipitado de células se resuspendió en 15-20 mL de medio de crecimiento celular.
5. Con objeto de deshacer grumos celulares, las células resuspendidas se pasaron a través de una aguja y, posteriormente, se diluyeron 1:2 en el medio correspondiente.
6. Por último, se realizó un recuento celular en un contador Cedex_01 (Innovartis), que detecta las células vivas teñidas con azul tripan (Sigma Aldrich).

13.2. Determinación de la dosis efectiva 50 (DE50) de los extratos acetónicos

Se utilizó el método del *Thiazolil blue tetrazolium bromide* (MTT) que se detalla a continuación:

1. Se dispensaron 200 µL de suspensión celular (entre 60.000 y 30.000 células/pocillo) en pocillos de placas *microtiter* de 96 pocillos, y éstas se incubaron a 37°C, en atmósfera aerobia y 5% de CO₂, durante 24 h (excepto para la línea celular CCL204, 48 h), para permitir su crecimiento.

2. Pasado este tiempo, el crecimiento celular activo se corroboró mediante observaciones al microscopio.
3. Se descartó el medio de cultivo y se añadieron, a cada pocillo, 190 µL de medio nuevo y 200 µL de una dilución 1:200 de extracto acetónico, previamente preparada.
4. Las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera aerobia y 5% de CO₂, durante 24 h, y se lavaron con el tampón PBS 1x, una vez descartado el medio de cultivo.
5. En cada pocillo, se adicionaron 100 µL de MTT (0,5 mg/mL), y las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera aerobia y 5% de CO₂, durante 3 h. Posteriormente, se descartó el MTT y se agregaron 100 µL de DMSO puro por pocillo, para disolver los cristales de azul formazán (azul de tetrazolio nitrado reducido).
6. Las placas se agitaron y los resultados de crecimiento se obtuvieron midiendo la D.O a 570 nm en un espectrofluorímetro Victor2™ Wallac (Perkin-Elmer). El porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{1 - (\text{D.O. células tratadas} - \text{D.O. control positivo})}{(\text{D.O. control negativo} - \text{D.O. control positivo})} \times 100$$

Los valores de la dosis efectiva 50 (DE50) se calcularon mediante un análisis de regresión. En donde DE50 se define como la concentración inhibitoria del extracto que mata el 50% de las células tumorales.

En este ensayo se incluyeron siempre los siguientes controles:

- De crecimiento (control negativo): 190 µL de medio y 10 µL de DMSO 20% (mata alrededor del 1% de las células).
- Positivo: 190 µL de medio y 10 µL de metil metano sulfonato (MMS) a concentraciones de 0,5, 1 ó 5 mg/mL.
- Para cada línea celular se realizó una curva de controles, utilizando ocho diluciones seriadas de actinomicina, doxorubicina, rotenona y MMS, de concentraciones entre 0,00976 y 10 mM.

Actinomicina: antibiótico polipeptídico que se une al ADN e impide la acción de la ARN polimerasa. También puede unirse a la doble cadena de ADN e interferir en su replicación.

Doxorrubicina: antibiótico antraciclino que ejerce sus efectos sobre las células cancerosas intercalándose entre las bases del ADN, bloqueando su síntesis. O inhibiendo las enzimas que participan en la replicación del ADN.

Rotenona: sustancia de origen vegetal utilizada como insecticida, actúa sobre la bioquímica mitocondrial celular.

PBS 1x: NaCl (8 g), KCl (0,2 g), Na₂HPO₄ (1,44 g), KH₂PO₄ (0,24 g), disolver en 800 mL de agua destilada estéril. Ajustar a pH 7,4, llevar hasta un volumen final de 1 L de H₂O y autoclavar.

Solución Stock MTT (5 mg/mL): 100 mg de MTT (Sigma Aldrich) en 20 mL de PBS a un pH 7,5. Esterilizar mediante filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Añadir 16 mL de MTT a 160 mL de medio *Minimum Essential Medium* (MEM 1x Invitrogen).

13.3. Determinación de la dosis efectiva 50 (DE50) de trichodermina y de tirosol

Se prepararon unas soluciones iniciales de trichodermina y de tirosol a 8 y 6 mg/mL, respectivamente. A partir de ellas y utilizando DMSO, se prepararon diluciones seriadas de cada metabolito, desde 10^{-3} hasta 10^{-7} . Y, posteriormente, se evaluó la DE50 en las líneas celulares Hep-G2, MCF-7 y A-549 con el método de alamarblue® (Invitrogen), que se detalla a continuación:

1. Se dispensaron 100 μ L (entre 60.000 y 30.000 células/pocillo) de suspensión celular (previamente preparadas según el apartado 13.1) en pocillos de placas *microtiter* de 96, y éstas se incubaron a 37°C, en atmósfera aerobia y 5% de CO₂, durante 24 h para permitir el crecimiento de las células.
2. Pasado este tiempo, el crecimiento celular activo se corroboró mediante observaciones al microscopio.
3. Se ensayaron las diferentes soluciones, previamente preparadas, de trichodermina o tirosol, añadiendo a cada pocillo 1 μ L de metabolito; y las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera aerobia y 5% de CO₂, durante 72 h.
4. Se añadieron, por pocillo, 10 μ L de reactivo alamarblue®, y las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera aerobia y 5% de CO₂, durante 3-4 h.
5. Se leyó la fluorescencia a 570 nm. El porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares y los valores DE50, se calcularon mediante la fórmula descrita en el apartado 13.2.

En este ensayo se incluyeron siempre los siguientes controles:

- De crecimiento (control negativo): 100 μ L de medio y 10 μ L de DMSO 20%
- Positivo: 100 μ L de suspensión celular y 1 μ L de taxol.

13.4. Ensayo de actividad citotóxica de la trichodermina y el tirosol

Para este ensayo se utilizó el equipo xCELLigence RTCA (*Real-time cell analyzer*-Roche Applied Science), el cual monitoriza los eventos celulares en tiempo real. El sistema realiza medidas de impedancia eléctrica (registrada como un valor de IC: índice celular) a través de micro-electrodos integrados en la parte inferior de las placas-E de 96 pocillos.

Inicialmente, se cultivó la línea celular de hepatocitos humanos sanos (ZBhu001010 Tebu-bio®) en el medio HCM™ Bullet Kit® (apartado 13.1). Además, se prepararon seis diluciones de trichodermina y de tirosol desde 10^{-3} hasta 10^{-9} μ M, y se evaluó su actividad citotóxica siguiendo el siguiente protocolo:

1. En cada pocillo de las placas-E se añadieron 25 μL de colágeno (Roche Applied Science), para formar un recubrimiento de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y promover la adherencia celular. Las placas-E fueron incubadas a 37°C durante 1-2 h. El colágeno remanente fue retirado, y se hizo un lavado con tampón PBS o con medio de cultivo celular.
2. Tras este periodo de tiempo, las placas-E se colocaron en el incubador RTCA y se escanearon automáticamente, con objeto de revisar sus propiedades y medir el fondo de las mismas.
3. Las placas-E se retiraron del incubador RTCA y, en cada pocillo, se añadieron 100 μL de suspensión celular (20.000 células/pocillo) y 100 μL del medio de cultivo adecuado, y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que las células se adhirieran y se distribuyeran uniformemente.
4. Las placas-E se colocaron nuevamente en el incubador RTCA y se escanearon automáticamente, realizándose una lectura celular cada 30 minutos.
5. Las placas se incubaron durante 24 h y, seguidamente, se añadieron 2 μL de las soluciones de trichodermina o tirosol.
6. Se realizaron lecturas de impedancia desde tiempo 0 hasta 98 h, con lecturas cada 14 h.

Se realizaron las siguientes determinaciones, utilizando el taxol como control en todos los casos:

- Curva sigmoidal de dosis-respuesta o DRC (índice celular normalizado a un tiempo determinado *versus* la concentración) para la trichodermina, el tirosol o el taxol.
- Control dinámico de la tasa y el inicio de citotoxicidad mediada por la trichodermina o el taxol frente a la línea celular de hepatocitos humanos sanos ZBhu001010 (Tebu-bio®).
- Determinación de la DE50 a las 24, 48 y 72 h, de la trichodermina o el taxol frente a la línea celular de hepatocitos humanos sanos ZBhu001010 (Tebu-bio®).

Índice celular normalizado: El *software* del equipo xCELLigence divide las lecturas de los IC de todos los pocillos y para todos los tiempos entre el valor del IC de los pocillos individuales en un mismo punto y tiempo, esta relación se llama base de tiempo y se le asigna un valor de 1. De esta forma los valores IC normalizados pueden ser comparados entre pocillos. Así, para un pocillo, el IC normalizado es la impedancia presentada como un porcentaje del valor en la base de tiempo.

13.5. Mecanismo de acción antitumoral de la trichodermina

Este ensayo se realizó en el equipo xCELLigence RTCA. Inicialmente, las líneas celulares de carcinoma hepatocelular Hep-G2 y Hep-3B se cultivaron en medio EMEM (apartado 13.1). Además, se prepararon seis diluciones de trichodermina o taxol, en DMSO, desde 10^{-3} hasta 10^{-9} μM , y se evaluó su actividad antitumoral siguiendo el protocolo descrito en el apartado 13.4 pero sin recubrir los pocillos con colágeno. Y se realizaron las siguientes determinaciones, utilizando el taxol y el DMSO 5% como controles, en todos los casos:

- Generación de un perfil compuesto-específico (trichodermina o taxol), el cual es dependiente del mecanismo biológico de acción de dicho compuesto.
- Determinación para trichodermina y taxol de la DE50 frente a las líneas tumorales Hep-G2 y Hep-3B a las 24, 48 y 72 h.
- Proliferación celular (tiempo de duplicación celular en horas) de las líneas tumorales Hep-G2 y Hep-3B previamente tratadas con trichodermina o taxol.

13.6. Ensayo de reversión de morfología celular

Se utilizaron las líneas celulares CRL-8798 (mama sana), CCD-16Lu (pulmón sano), MC7-7 (mama tumoral) y A-549 (carcinoma de pulmón), para analizar la existencia de reversión en la morfología celular, empleando el siguiente protocolo:

1. Todas las líneas celulares, cultivadas según el apartado 13.1, fueron tratadas utilizando el extracto acetónico procedente de un cultivo en medio PDB de *T. brevicompactum* IBT 40841. Las líneas celulares tratadas y sus respectivos controles, se incubaron a 37°C durante 24 h en una atmósfera de 5% CO₂.
2. Transcurrido el tiempo de incubación, se observó la morfología de las líneas celulares por microscopía. Después, se descartó el medio de cultivo, se lavó una vez con el tampón PBS 1x, se agregó medio nuevo y se incubó a 37°C y atmósfera de 5% CO₂.
3. Con ayuda de un microscopio, se realizó un seguimiento de la morfología de las líneas celulares tras 6, 24 y 48 h de incubación.

14. ENSAYOS ANTIFÚNGICOS

14.1. Ensayo en cultivos duales

La cepa silvestre y los transformantes de *T. brevicompactum* IBT 40841 se enfrentaron a *R. solani*, *B. cinerea* y *P. irregulare* en placas de PDA. Cilindros de agar de 5 mm de diámetro procedentes de colonias en crecimiento activo de *T. brevicompactum* y del patógeno se colocaron en las placas de PDA a una distancia de 5,5 cm, y se incubaron a 28°C durante 10 días. Se analizó el comportamiento del crecimiento de cada cepa de *Trichoderma* frente a los patógenos. Cada uno de los enfrentamientos se llevó a cabo por triplicado.

14.2. Ensayos “in vivo”: *T. brevicompactum*-tomate-*B. cinerea*

1. Esporas de las cepas de *Trichoderma* (silvestre y transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5) (recogidas según el apartado 4.1.1) se utilizaron para pildorar semillas de tomate, previamente desinfectadas. En el pildorado se empleó 1 mL de una suspensión de 2x10⁸ esporas/mL, y las semillas se mantuvieron en una placa Petri abierta, dentro de

una campana de flujo laminar, hasta que estuvieron totalmente secas (12 h aproximadamente).

2. Las semillas pildoradas se sembraron en alveolos que contenían tierra estéril, a razón de dos semillas por alveolo. Las plantas resultantes crecieron durante un mes bajo condiciones de invernadero.
3. Se inocularon cuatro hojas por planta, dos puntos de inoculación por hoja y se utilizaron 5×10^5 esporas de *B. cinerea*, en 8 μ L de solución de germinación, por cada punto de inoculación. Se incluyeron como controles negativos inoculaciones con únicamente solución de germinación. Las plantas inoculadas se dispusieron en cajas de plástico, 8 alveolos por caja, se añadió agua en el fondo y se sellaron herméticamente para generar una atmósfera con mucha humedad.
4. Las cajas plásticas que contenían las plantas de tomate inoculadas se mantuvieron 48 h, en un fitotrón con 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 22°C y, pasado ese tiempo, se midieron los diámetros de las lesiones producidas por el patógeno. Se utilizó una escala de 1 a 5 según el tamaño de la lesión (5=1,5 cm; 4=1 cm; 3=0,5 cm; 2=0,3 cm y 1=0,2 cm). El ensayo se realizó por duplicado.

15. ENSAYOS DE GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE LA PLANTA

15.1. Ensayos de germinación

Para analizar si la sobreexpresión del gen *Tbtri5* afectaba a la capacidad de germinación de una planta, se realizaron ensayos en tomate por triplicado, utilizando la cepa IBT 40841 y los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, previamente seleccionados.

1. Semillas de tomate, previamente desinfectadas, se pildoraron con esporas de las cepas de *Trichoderma* incluidas en este ensayo según se describe en el apartado 14.2.
2. Las semillas pildoradas se sembraron en cajas de plástico (Phytatray II, Sigma Aldrich) que contenían medio MS, a razón de 16 semillas por caja, y se incubaron durante 1 semana a 22°C en un fitotrón, programado con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se incluyeron como control, semillas pildoradas con agua estéril.
3. Se determinó el porcentaje de germinación de las semillas para cada una de las cinco condiciones de pildoración ensayadas.

15.2. Ensayo de crecimiento

Para determinar si la sobreexpresión del gen *Tbtri5* afectaba al crecimiento de las plantas, se realizaron ensayos en tomate, en placa y en alveolos, utilizando la cepa IBT 40841 y los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, previamente seleccionados.

15.2.1. Ensayo "in vitro"

Se utilizó el protocolo de Contreras-Cornejo y col. (2009), que se realizó en triplicado y se detalla a continuación:

1. Placas Petri, conteniendo medio MS, se sembraron con semillas de tomate (se colocaron a la misma altura 5 semillas por placa).
2. Las placas se sellaron con cinta quirúrgica y en su parte inferior se cubrieron con papel de aluminio. Posteriormente, se incubaron a 22°C, durante tres días, y en posición vertical en un fotoperiodo, programado con 16 h de luz y 8 h de oscuridad.
3. Pasado ese tiempo, las placas se inocularon, a 5 cm de distancia de la raíz primaria de la planta germinada, con una suspensión de 20 μ L que contenían 10^6 esporas de *Trichoderma*. Se incluyó como control negativo, inoculaciones con 20 μ L de agua estéril.
4. Las placas, de nuevo, se sellaron con cinta quirúrgica y en su parte inferior se cubrieron con papel de aluminio, y se incubaron, durante 10 días, bajo las condiciones descritas anteriormente.
5. Se midió el tamaño de las plantas, el tamaño de la raíz primaria y el número de raíces secundarias para cada una de las condiciones ensayadas.

15.2.2. Ensayo "in vivo"

Se realizó en duplicado el ensayo descrito en el apartado 14.2, pero sin patógeno, y se evaluó el crecimiento de las plantas para las cinco condiciones ensayadas: control, cepa silvestre (*T. brevicompactum* IBT 40841) y tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5* (Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5).

16. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y SOFTWARE UTILIZADOS

16.1. Búsqueda de secuencias similares en bases de datos

16.1.1. FASTA

El algoritmo FASTA (Pearson y Lipman, 1988) es una aproximación al algoritmo de Smith-Waterman (1981), que divide la secuencia en palabras solapantes, con una longitud de dos letras para proteínas o seis para ácidos nucleicos. Cada secuencia de la base de datos es dividida de la misma forma. Estas dos listas de palabras se comparan para encontrar palabras idénticas en ambas secuencias.

Permite diferentes combinaciones entre ácidos nucleicos y proteínas, sean estos las secuencias problema o las bases de datos de secuencias. Nos proporciona un valor, el Z-score, que después es convertido en un valor E (*E-value*), como en el caso de BLAST.

Las comparaciones de secuencias usando este algoritmo se llevaron a cabo en el servidor del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI, Saffron Walden, Reino Unido) disponible en la página web <http://ebi.ac.uk/fasta33>.

16.1.2. BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) constituye una colección de diferentes programas que permiten distintas combinaciones entre ácidos nucleicos y proteínas, sean estos las secuencias problema o las bases de datos de secuencias. Lleva a cabo alineamientos de tipo local entre una secuencia desconocida y una base de datos. Las mayores ventajas de BLAST son su gran velocidad y la evaluación estadística que realiza de los resultados. El parámetro estadístico correspondiente al valor E se calcula en función de que un alineamiento ocurra por azar. Por ejemplo, si tenemos un valor E igual a 0, significa que la probabilidad de que ese alineamiento haya ocurrido por azar es 0.

Las comparaciones de secuencias usando las diferentes variantes del algoritmo BLAST (BLASTN, BLASTX, BLASTP) se llevaron a cabo en la página web del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

16.2. Alineamiento de secuencias

Hay dos tipos principales de alineamiento de secuencias: global y local. El global optimiza el alineamiento sobre toda la longitud de la secuencia, mientras que en el alineamiento local, tienen prioridad fragmentos de la secuencia con una gran cantidad de coincidencias.

Un alineamiento múltiple de secuencias de proteínas de la misma familia nos proporciona información sobre la evolución en cada aminoácido y muestra también las posiciones que son clave para mantener el plegamiento y la función de las proteínas.

Para los alineamientos realizados en este trabajo se empleó el programa *ClustalX* (Thompson y col., 1994).

16.3. Otras manipulaciones de secuencias

La búsqueda de marcos de lectura abierta (*Open Reading Frames*, ORFs) sobre las secuencias de ADN, la traducción de los mismos a la secuencia proteica y un primer análisis

elemental de esta secuencia proteica se realizaron con el programa *EditSeq*, que forma parte del paquete informático *Lasergene* (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, EE.UU).

La búsqueda de motivos o dominios en la secuencia primaria de la proteína se llevó a cabo en la base de datos de dominios SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*), que se puede consultar en la página web <http://smart.embl.de>.

16.4. Análisis estructural de proteínas

Los métodos de predicción de la estructura secundaria de una proteína tratan de predecir si un residuo concreto pertenece a uno de estos tres estados: hélice α , hoja plegada β o bien, a segmentos irregulares o no ordenados de la proteína. Estos métodos han evolucionado mucho en los últimos años. Al principio se basaban en la probabilidad estadística de que un aminoácido concreto perteneciera a una de las tres estructuras posibles. Luego, una segunda generación de estos métodos incluyó la influencia del ambiente local en el que se situaba cada aminoácido. La exactitud de estos métodos nunca superó el 60%. En la tercera generación, se incluyeron alineamientos múltiples como base de métodos de predicción.

En la actualidad se usan métodos basados en redes neuronales, técnicas que permiten el aprendizaje del método. En este trabajo se utilizó el programa *PSIPRED* (Jones, 1999), que alcanza una exactitud del 75%. Está accesible vía web en la dirección <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>.

16.5. Análisis de los dominios de unión a factores de transcripción

La búsqueda de los dominios de unión a factores de transcripción presentes en la secuencia de ADN de las zonas reguladoras, se realizó con el programa *MatInspector Profesional* (Quandt y col., 1995). Este programa emplea la base de datos TRANSFAC y está disponible en versión de acceso limitado en la página web <http://genomatix.de>. También puede consultarse de forma gratuita, previo registro, en <http://gene-regulation.com/pub/databases.html#transfac>.

16.6. Otras herramientas de predicción

La identificación de posibles péptidos señal sobre la secuencia primaria de las proteínas se llevó a cabo con el programa *SignalP* v2.0 (Nielsen y col., 1997), accesible en la dirección web <http://cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>.

El análisis de la secuencia de las proteínas mediante la aplicación *Scan Prosite* (www.expasy.org/tools/scanprosite/) revela la presencia de posibles sitios de glucosidación, fosforilación, miristilación y sulfatación.

El perfil hidropático de las proteínas se calculó según el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) empleando la aplicación *Protean* (*Lasergene*, DNASTAR Inc.). La predicción de la posible estructura tridimensional de la proteína se llevó a cabo en el servidor web ESyPred3D (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) que reconoce el plegamiento utilizando perfiles de secuencias y múltiples programas de alineamiento. Para analizar los modelos propuestos se empleó el programa de visualización de modelos *DeepView-Swiss-PdbViewer* disponible en la página web <http://www.expasy.ch/spdbv/>.

16.7. Análisis filogenéticos

El objetivo de un análisis filogenético es caracterizar la evolución. Puede llevarse a cabo por atributos morfológicos de los organismos, o bien, como se ha hecho en los últimos años, siguiendo las mutaciones en el material genético de los organismos.

Para la construcción de árboles filogenéticos se ha utilizado el programa MEGA V4, usando el método *Neighbour-Joining* (NJ). En este caso, la distancia entre dos secuencias (la longitud de las ramas) en el árbol final corresponde a la similitud entre dos secuencias.

La estabilidad de las ramas de un árbol filogenético se mide mediante un test *Bootstrap* (Felsenstein, 1985), el cual se lleva a cabo construyendo un árbol basado en un subconjunto de las columnas del alineamiento múltiple en el que se basa el árbol original. Este proceso se repite múltiples veces y nos da el número de veces en el que el análisis proporciona el mismo árbol final.

16.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos se sometieron a un análisis de la varianza para comprobar si las diferencias entre las cepas analizadas eran estadísticamente significativas. Para ello se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney del programa SPSS 15.0 para Windows software (SPSS, Chicago, Illinois, EE.UU.).

16.9. Herramientas de edición

En esta memoria se utilizaron los siguientes programas de edición específicos de biología molecular o manejo de bibliografía:

- *pDRAW* (www.acaclone.com). Se utilizó para dibujar y editar plásmidos a partir de su secuencia.

- *DNA Strider* (CEA, Gif sur Yvette, Francia). Se empleó para la edición de las secuencias de ADN y proteínas.
- *Genedoc* (www.psc.edu/biomad/genedoc). Se utilizó para la edición de los alineamientos.
- Referente Manager 11. Se usó para la gestión y edición de la bibliografía.

17. CASAS COMERCIALES Y PROVEEDORES

Amersham: Amersham Biosciences A.B, Uppsala, Suecia (www.amershambiosciences.com).

Applied Biosystems: Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU. (www.appliedbiosystem.com).

ATCC: The Global Bioresource Center; American Type Culture Collection., Manassas, Virginia, EE.UU. (www.atcc.org).

Beckman Coulter: Beckman Coulter España S.A., Madrid, España (www.beckmancoulter.es).

Bio-Rad: Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU. (www.biorad.com).

Biotoools: Biotoools B y M Laboratories, Madrid, España (www.biotoools.net).

Difco: Difco Becton Dickinson, Sparks, Maryland, EE.UU. (www.difco.com).

Duchefa: Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Holanda (www.duchefa.com).

CABI: CABI Bioscience, Egham, Reino Unido (www.cabi.org).

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia, España (www.cect.org).

Eppendorf: Eppendorf, Hamburgo, Alemania (www.eppendorf.com).

Fermentas: Fermentas Life Science, Burlington, Ontario, Canadá (www.fermentas.com).

Fujifilm: Fuji Photo Film Europa, Düsseldorf, Alemania (www.fujifilm.eu).

IBT: Institutet for Bioteknologi, Lyngby, Dinamarca (www.ibt.unam.mx).

IMI: International Mycological Institute. CABI Bioscience, Egham, Reino Unido (www.cabi.org).

Innovartis: Innovartis. S.L., Madrid, España. (www.innovartis.es).

Invitrogen: Invitrogen, Groningen, Holanda. (www.invitrogen.com).

Isogen: Isogen Life Science, Maarssen, Holanda (www.isogen-lifescience.com)

Merck: Merck KGaA, Daarssen, Holanda (www.merck.com).

Millipore: Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU (www.millipore.com).

MRC: Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio, EE.UU (www.mrcgene.com).

MSD: Merck Sharp and Dohme, Madrid, España (www.msd.es).

NBT: NewBiotechnic S.A., Sevilla, España (www.nbt.es).

Perkin-Elmer: Perkin-Elmer Inc., Tres Cantos, Madrid, España (www.perkinelmer.com).

Promega: Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU. (www.promega.com).

QBio Gene: QBio Gene, Montreal, Quebec, Canadá (www.qbiogene.com).

Roche: Roche Applied Science, Basilea, Suiza (www.roche.com).

Sigma Aldrich: Sigma-Aldrich Co., San Luis, Missouri, EE.UU. (www.Sigma-aldrich.com).

Stratagene: Stratagene, La Jolla, California, EE.UU. (www.stratagene.com).

TECAN: Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza (www.tecan.com).

Teknokroma: Teknokroma, Barcelona, España (www.teknokroma.es).

Thermo: Thermo Fisher Scientific, Madrid, España (www.thermofisher.com).

Tebu-bio: Tebu-bio Innovatible Lab Services and Reagents, Barcelona, España (www.tebu-bio.com).

Whatman: Whatman Laboratory Products Inc. Clifton, New Jersey, EE.UU. (www.whatman.com).

RESULTADOS

1. SÍNTESIS DE TERPENOS: RESULTADOS PREVIOS

La mayoría de los antibióticos que se usan en la industria farmacéutica tiene su origen en la microbiota del suelo y la rizosfera. La aplicación clínica de los antibióticos más eficaces requiere cepas microbianas superproductoras, capaces de secretar al medio cantidades rentables de antibiótico. En la rizosfera, sin embargo, no se encuentran esos mutantes superproductores, sino cepas silvestres que liberan al medio cantidades significativamente menores de metabolitos secundarios, muchos de ellos con potencial capacidad antibiótica cuando se dispensan a dosis más altas.

En nuestro laboratorio se habían clonado y caracterizado, a partir de las ESTs 5784, 1610 y 3496, dentro del marco del proyecto *TrichoEST*, los genes *hmgR*, *erg1* y *erg7*, que codifican, en la ruta de biosíntesis de terpenos, la hidroximetil glutaril CoA reductasa, la escualeno epoxidasa y la lanosterol ciclase de *T. harzianum* T34, respectivamente (Figura 14) (Cardoza y col., 2006b y 2007).

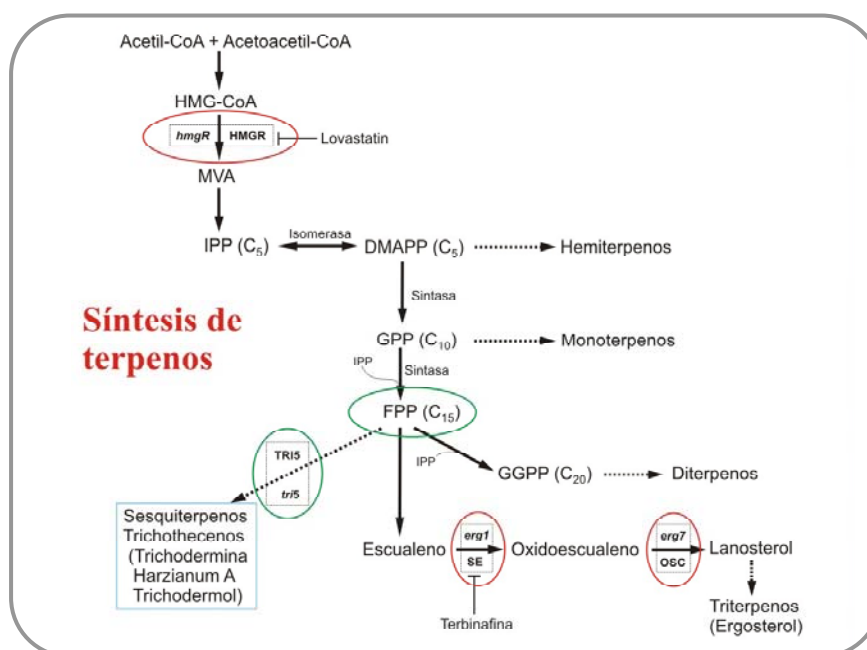


Figura 14. Representación esquemática de la ruta biosintética de terpenos. Los genes que codifican 3'-hidroximetilglutaril-CoA reductasa (*hmgR*), escualeno epoxidasa (*erg1*) y lanosterol ciclase (*erg7*), caracterizados en *T. harzianum* CECT 2413, aparecen rodeados de una línea roja. Las líneas truncadas indican los puntos de la ruta inhibidos por los antibióticos lovastatina o terbinafina. El paso crucial de farnesil pirofosfato (FPP) a compuestos sesquiterpénicos aparece rodeado por una línea verde. MVA (mevalonato), IPP (isopentil difosfato), DMAPP (dimetilalil difosfato); GPP (geranil difosfato); GGPP (geranil geranil difosfato).

Antes de comenzar esta Tesis Doctoral, en nuestro grupo se había construido una minigenoteca de ADN genómico de *T. brevicompactum* IBT 40841 en el vector *lambda* DASH II (Stratagene). Esta genoteca de ADN genómico se utilizó para aislar el gen *Tbtri5* de *T.*

brevicompactum IBT 40841 y en su escrutinio se utilizó una sonda heteróloga que se obtuvo, mediante PCR, a partir de *T. arundinaceum* ATCC 90237.

Por tanto, el punto de partida de este trabajo ha sido el gen *Tbtri5*, que codifica la trichodieno sintasa de *T. brevicompactum*, enzima que cataliza la primera etapa de la ruta de biosíntesis de sesquiterpenos a partir de farnesil pirofosfato (FPP).

2. EL GEN *Tbtri5* DE *T. brevicompactum* IBT 40841

La secuencia del gen *Tbtri5* tiene 1226 pb y al traducirla a aminoácidos se produce una ruptura en la fase de lectura. La presencia de secuencias típicas de procesamiento de intrones en 5' y 3', y de formación del lazo (Tabla 6), permitieron identificar la existencia de un intrón de 59 pb. La secuencia completa de la región génica clonada de *Tbtri5*, incluye 367 pb de región promotora, se muestra en el apéndice de esta memoria y se depositó en la base de datos de secuencias *GenBank* con el número de acceso FN356926.

Tabla 6. Intrón del gen *Tbtri5*. Las secuencias consenso para hongos filamentosos están tomadas de Ballance (1986). Las bases que no coinciden con el consenso se indican en minúscula.

	Inicio de procesamiento del intrón	Sitio de formación del "lazo"	Fin de procesamiento del intrón
Consenso	GTAHGTY	WRCTRAC	MYAG
Intrón de Tb	GTAaGcT	TGCTAAC	TTAG

Tb: *T. brevicompactum*

2.1. Estudio de la secuencia del promotor de *Tbtri5*

Se secuenciaron y analizaron 367 pb de la región promotora del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841 (también depositada en *GenBank* con el número de acceso FN356926). Al analizar *in silico* esta secuencia, en primer lugar se buscaron los elementos fundamentales de una región reguladora de este tipo. En las posiciones -23 y -144 respecto al codón de inicio, se localizaron dos secuencias que podrían ser posibles cajas TATA (TATAGAC y TATACAA), pero ninguna de ellas se adapta exactamente a la secuencia establecida 5'-TATA(T/A)A-3'. En la secuencia del promotor estudiada se encontraron en las posiciones -19, -61, -96 y -175 respecto al codón de iniciación cuatro cajas 5'-CAAT-3'; en ellas se une el complejo trimérico HAP2/3/4, implicado en la regulación de genes relacionados con el metabolismo del carbono (Zeilinger y col., 2001).

Se llevó a cabo un estudio teórico para buscar sitios de unión a factores de transcripción cuyas secuencias consenso están definidas. Se empleó la aplicación *MatInspector* usando la base de datos TRANSFAC, restringida a hongos (Figura 15).

Se identificaron dos secuencia 5'-HGATAR-3', una de ellas en la cadena codificante (-232) y la otra en la cadena complementaria (-259). Esta secuencia se ha descrito en *A. fumigatus* y *A. nidulans* como sitio de unión a factores de transcripción GATA, involucrados en la expresión de genes *sreA*, los cuales reprimen la expresión de genes de biosíntesis de sideróforos, regulando así el metabolismo del hierro (Power y col., 2006). Además, esta secuencia está implicada en la unión de factores de transcripción (AreA o Nit2) relacionados con el metabolismo del nitrógeno. En *A. nidulans*, AreA regula el metabolismo del nitrógeno en respuesta a los niveles extracelulares de glutamina (Ravagnani y col., 1997). Su homólogo en *N. crassa* es Nit2 (Scazzocchio, 2000).

También se encontró una secuencia 5'-AGGGG-3' en la cadena complementaria (-12). En esta secuencia se unen las proteínas Msn2p y Msn4p, que están implicadas en la tolerancia a diferentes estreses en *S. cerevisiae* (Gorner y col., 1998). Se localizó una secuencia 5'-GCCARG-3' en la cadena codificante (-133), una zona de unión de la proteína PacC que, en *A. nidulans*, está implicada en la regulación por pH (Tilburn y col., 1995).

Por otro lado, se identificó en la región promotora del gen *Tbtri5* un sitio de unión para la proteína TRI6 (5'-CAAGGC-3'), en la posición -299 respecto al codón de iniciación.

Además se encontraron, entre otros, posibles sitios de unión para los siguientes factores de transcripción:

- AbaA: regulador que interviene en la diferenciación de los conidios y, por tanto, en la activación de genes implicados en el desarrollo (Andianopoulos y Timberlake, 1994; Borneman y col., 2000).
- ABF-1 y ABF-C: regulador de genes implicados en la activación transcripcional, el silenciamiento génico, la replicación y reparación del ADN (Della y col., 1990).
- GCR1: regulador de genes glucolíticos (Uemura y col., 1997; Sasaki y col., 2005).
- GAL4 y LAC9: activadores que median la respuesta a la presencia de galactosa (Wray y col., 1987; Brown y col., 2009).
- HSF: responsable de la regulación de la expresión de las proteínas de choque térmico (Fernandes y col., 1994; Akerfelt y col., 2007).
- MAT1: regulador que interviene en la diferenciación sexual (Kjaerulff y col., 1997).
- MATa: regulador de la inducción de esporulación (Kurischko y col., 1999).
- MCM1: regulador de genes implicados en el control del ciclo celular, en la síntesis de pared celular, en el metabolismo celular, en la activación de glicoproteínas secretadas bajo

- condiciones de estrés térmico y en el metabolismo de la arginina (Kuo y Granyhack, 1994). Miembros de la familia MADS de factores trans, regulan los genes por interacción con distintos cofactores como $\alpha 1$, $\alpha 2$ y Ste12 (Mead y col., 2002).
- STE11: regulador de genes implicados en el control del ciclo celular, necesarios para la reproducción sexual entre dos células haploides (Kjaerulff y col., 2007).
 - STRE: regulador transcripcional de genes de respuesta a estreses osmóticos, térmicos u oxidativos (Yoshikawa y col., 2008).

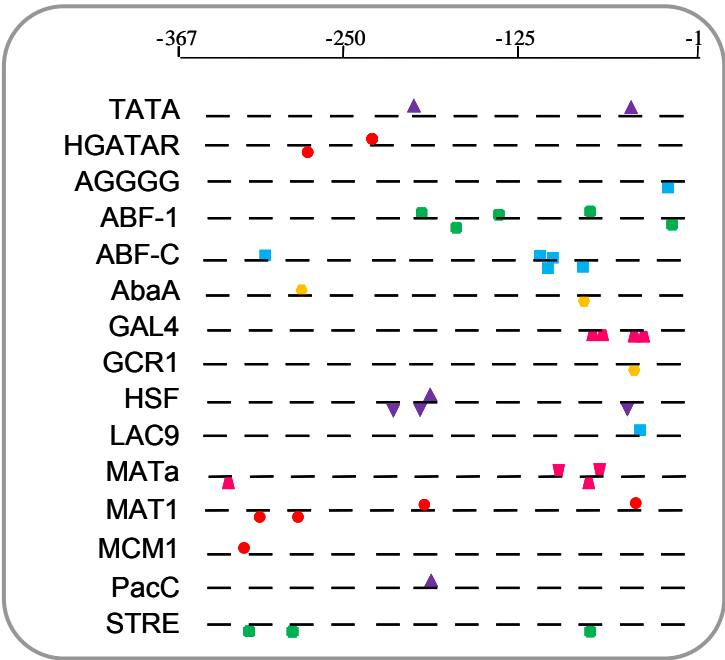


Figura 15. Estudio de 367 pb de la región promotora del gen *Tbt15* de *T. brevicompactum* IBT 40841. El nombre que aparece al inicio de cada línea indica un factor de transcripción. Este se representa por distintos símbolos a lo largo de la secuencia. Si el símbolo aparece encima de la línea, la secuencia se encontró en la cadena codificante y viceversa. Para más detalles consultar el texto.

También se analizó el entorno del lugar de inicio de la traducción, que presenta una secuencia consenso característica (Goldman y col., 1998). Las coincidencias se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Región adyacente al codón de iniciación de la traducción que aparece más frecuentemente en *Trichoderma* y la que presenta el gen *Tbt15* (Goldman y col., 1998).

Secuencia consenso	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6
<i>Trichoderma</i>	T/C	C	A	A	A/C	A	U	G	A/Y	T/G	T/A
<i>Tbt15</i>	T	C	A	T	C	A	U	G	G	T	T

2.2. Análisis de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína TbTRI5

La secuencia del gen *Tbtri5* tiene 1226 pb y al traducirla, teniendo en cuenta ya la presencia del intrón, se obtuvo una secuencia de 388 aminoácidos. El peso molecular teórico de la proteína madura es de 44,93 kDa y su punto isoeléctrico teórico de 5,26. La estructura primaria de la proteína deducida consta de 41 aminoácidos básicos (K, R) (10,6%), 60 ácidos (D, E) (15,5%), 100 polares o hidrofílicos (N, C, Q, S, T, Y) (25,8%) y 177 hidrofóbicos (A, F, G, I, L, M, P, V, W) (45,6%). En la composición de aminoácidos, el que se encuentra en mayor proporción es el ácido glutámico (9,02%), seguido de leucina (7,5%) y de alanina (7,2%).

Al analizar *in silico* la secuencia de aminoácidos a través del programa SignalP V2.0, no se detectó la presencia de un péptido señal. Esto se explica si observamos el perfil hidropático de TbTRI5 (Figura 16), calculado según el algoritmo de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982). La presencia de un péptido señal se relaciona con un alto grado de hidrofobicidad en esa región, y vemos que en esta proteína no hay un marcado carácter hidrofóbico al principio de la secuencia.

Un análisis realizado con el programa *ProP* v.1.0 para determinar prepro-péptidos dentro de la secuencia, reveló un sitio de corte en residuos de arginina o lisina.

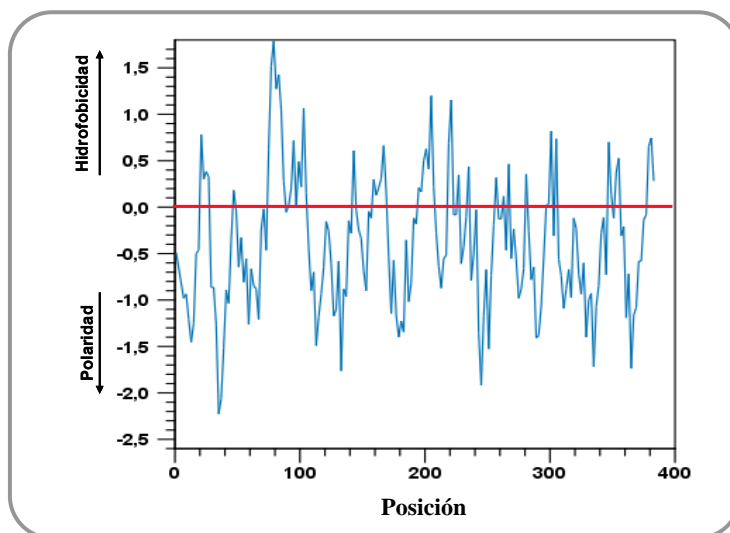


Figura 16. Representación gráfica del perfil hidropático de TbTRI5 calculado mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982).

Se realizó una predicción *in silico* de la estructura secundaria de la proteína mediante el programa *PSIPRED* (Figura 17). Se observó que en la estructura secundaria de TbTRI5 predominaban las regiones en hélices α (24) y solo se encontraron 4 regiones en hoja plegada β . Además, el análisis de la secuencia de la proteína mediante la aplicación *ScanProsite* reveló

la presencia de posibles sitios de fosforilación, glucosilación y miristilación en los siguientes residuos (Figura 17):

- Fosforilación por proteína kinasa C: treoninas 64 y 275, y serina 338.
- Fosforilación por proteína kinasa II: treoninas 17, 37 y 121, y serinas 30, 111, 162, 278, 322 y 354.
- Fosforilación por tirosina kinasa: tirosina 31.
- Glucosilación: asparragina 35.
- Miristilación: glicinas 117 y 195.



Figura 17. Secuencia de la proteína TbTRI5 de *T. brevicompactum* IBT 40841, incluyendo la predicción de su estructura secundaria llevada a cabo con el programa PSIPRED (Jones, 1999). Se señala con letras rojas el sitio identificado como prepro-péptido según el programa ProP v.1.0. Se han marcado con fondo amarillo las conformaciones en hélice α y con fondo verde las conformaciones en hoja plegada β . También se incluyen los posibles sitios de fosforilación, miristación y sulfatación deducidos con el programa Scan Prosite (www.expasy.org/tools/scanprosite).

La secuencia total de la proteína TbTRI5 se comparó mediante el algoritmo FASTA con las secuencias presentes en la base de datos UNIPROT. Las proteínas que presentaron un mayor nivel de similitud con TbTRI5 se resumen en la Tabla 8. La mayor parte de estas proteínas correspondían a trichodieno sintetas descritas en distintas especies de *Fusarium*,

aunque la función de algunas de ellas era desconocida debido a que sus secuencias procedían de proyectos de secuenciación.

Tabla 8. Proteínas con mayor similitud de secuencia con TbTRI5. El análisis se llevó a cabo empleando el algoritmo FASTA sobre la base de datos UNIPROT. Las proteínas están ordenadas en función de su valor E. Id: identidad.

Proteína	Organismo	Nº aa	E	%Id	Nº acceso	Referencia
Trichodieno sintasa	<i>Trichoderma arundinaceum</i>	388	2,9e-179	99	Q6A1B7	(Gallo y col., 2004)
Trichodieno sintasa	<i>Fusarium asiaticum</i>	383	7e-100	60,5	Q8NIH6	(Ward y col., 2002)
Trichodieno sintasa	<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	383	2,2e-99	60,5	Q6YMS8	
Trichodieno sintasa	<i>Gibberella zeae</i> (<i>Fusarium graminearum</i>)	375	2,4e-97	60	Q76PE4	
Fragmento de trichodieno sintasa	<i>Stachybotrys chartarum</i>	209	2,3e-64	67,3	Q6Y5A9	
Fragmento de trichodieno sintasa	<i>Fusarium culmorum</i>	211	1e-63	65,3	Q8J208	(Bakan y col., 2002)
Fragmento de trichodieno sintasa	<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	211	2,2e-63	66,2	Q6Y5B2	
Fragmento de trichodieno sintasa	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	199	7,1e-61	67,7	Q8J062	(Nielssen y col., 2004)
Fragmento de trichodieno sintasa	<i>Fusarium poae</i>	200	2,9e-60	67,2	Q8J1B4	(Nielssen y col., 2004)
Fragmento de trichodieno sintasa	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	196	5,8e-57	67,6	Q6XPS9	(Nielssen y col., 2004)
Fragmento de trichodieno sintasa	<i>Fusarium langsethiae</i>	190	2,2e-57	67,4	Q8J0B3	(Nielssen y col., 2004)

En la Figura 18 se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TbTRI5 y algunas proteínas que aparecen recogidas en la Tabla 8, realizado con el programa *Clustal X*. En dicho alineamiento se observan las tres regiones conservadas de estas proteínas que han sido descritas en la bibliografía y que forman parte del centro catalítico en cepas de los géneros *Fusarium*, *Myrothecium* y *Stachybotrys*, y que además han sido detectadas en *T. arundinaceum* (Gallo y col., 2004, Degenkolb y col., 2008a).

La primera región conservada es un motivo rico en aspartatos DDXXD, Asp¹⁰⁰-Asp¹⁰¹-X¹⁰²-X¹⁰³-Asp¹⁰⁴, que se ha encontrado en todas las secuencias de terpeno ciclasas conocidas,

excepto en el género *Trichoderma*, donde el ácido glutámico sustituye a uno de los tres aspartatos (DDXXE), Asp¹⁰⁹-Asp¹¹⁰-X¹¹¹-X¹¹²-Glu¹¹³. La segunda región conservada se ha identificado como WVNDLMSFYKE, Trp²²³-Val²²⁴-Asn²²⁵-Asp²²⁶-Leu²²⁷-Met²²⁸-Ser²²⁹-Phe²³⁰-Tyr²³¹-Lys²³²-Glu²³³, aunque en *Trichoderma* aparece como WXNDLXSYKE, cambios que afectan a los aminoácidos de las posiciones 233 y 237 (Rynkiewicz y col., 2001). La tercera secuencia conservada que se denomina "motivo básico", se identifica como XXRYR, X³⁰²-X³⁰³-Arg³⁰⁴-Tyr³⁰⁵-Arg³⁰⁶, y en el género *Trichoderma* se localiza entre las posiciones 311 y 315, X³¹¹-X³¹²-Arg³¹³-Tyr³¹⁴-Arg³¹⁵ (Cane y col., 1996; Rynkiewicz y col., 2001; Gallo y col., 2004).

Dentro de estas regiones se localizan residuos conservados en todas las terpeno ciclasas y que forman parte del centro catalítico: D¹⁰⁰ y D¹⁰¹, participan directamente en la coordinación y unión de iones metálicos como Mg²⁺; N²²⁵, S²²⁹ y E²³³, relacionados con la quelación de esos iones, los cuales son importantes en las interacciones enzima-pirofosfato; y los residuos R³⁰⁴ y Y³⁰⁵, implicados en la interacción del sustrato (farnesil) con el difosfato (Rynkiewicz y col., 2001). En *Trichoderma* dichos residuos corresponden a las posiciones D¹⁰⁹, D¹¹⁰, N²³⁵, S²³⁸, E²⁴², R³¹³ y Y³¹⁴.

Se estudió la estructura de dominios de TbTRI5 en la base de datos SMART (<http://smart.embl.de>) y se encontró un dominio Fapy_DNA glyco (Formamidapirimidina-DNA glicosilasa N-terminal) que se extendía desde el aminoácido 55 hasta el 156 y que está implicado en la reparación, mediante la escisión de bases, del ADN dañado por oxidación o por agentes mutágenos. La predicción de la estructura terciaria para la proteína TbTRI5 se realizó con el programa ESyPred3D v1.0 por comparación con la cadena "A" de la trichodieno sintasa cristalizada de *F. sporotrichioides* (1JFG), con un índice de similitud del 54,8% (Figura 19). Se utilizó la secuencia de aminoácidos de la región comprendida entre E¹⁰ y Q³⁸⁸. El modelo obtenido para TbTRI5 muestra una disposición típica en hélice α , común a todas las terpeno ciclasas que se han descrito hasta ahora. Este tipo de dominios definen un sitio activo cónico e hidrofóbico que está constituido por las tres regiones conservadas anteriormente descritas y donde se localizan los residuos que componen el centro catalítico de la proteína (señalados en la Figura 19). Los sitios de unión y quelación de iones Mg²⁺ se encuentran en las partes laterales de la hendidura, y el sitio de unión al sustrato se localiza en la base de la hendidura formada por el "motivo básico" (Rynkiewicz y col., 2001).

TbTRI5	MVELNDVPGEEERATYLEMTVRLIDTVSNINENFDERVECHKAYAAAEHFAQPHVETLK-VPPKRNAAALKTIVGMCVYSWCRVSKEV	94
T.arundinaceum	MVELNDVPGEEERATYLEMTVRLIDTVSNINENFDERVECHKAYAAAEHFAQPHVETLK-VPPKRNAAALKTIVGMCVYSWCRVSKEV	94
S.chartarum	-----MEAEPTTEYFUGTAVRLLENVKKRISNYTRERVENLQAYNKAAAHFAQERQQLLK-VSPKRLEPSLRITVGMVYSWAVSKEL	85
M.roridum	-----MDEPTTEYFUGTAVRLLENVKKRISNYTRERVENLQAYNKAAAHFAQERQQLLK-VWPKRLEPSLRITVGMVYSWAVSKEL	85
F.sporotrichioides	-----MENEPTTEYFINTVRLLEYIRRRISNYTRERVENLQAYNKAAAHFAQERQQLLK-VDPKRIOASLRITVGMVYSWAVSKEC	85
G.zeae	-----MENEPTTEYFINTVRLLEYIRRRISNYTRERVENLQAYNKAAAHFAQERQQLLK-VDPKRIOASLRITVGMVYSWAVSKEC	85
N.fischeri	-----MDMNTSEANTYCESIVRFDAIEHDDLLDHEERVECHRHVHS-IAQYETEPLPRSLHGAPRRIAAVTRTISHFIVYCTSKLPRBA	88
A.niger	-----MTKAQTAVSPDEFKIITPFNETIPNIPPADEAFYKAVDKFAASGLPEDSIPHEVG-----TGEVLARCFYPSLPRDL	78
fp 5l vrlL 6y dnt eBr e1 a kaA hfa2 q 6k v p r a l Tivg vvs5 6s4e		
TbTRI5	MADLSIHYYTYTLDDSDRE--EAGTMAIWMEDLNARPOAHGTRVNDPIENVLRHYGCGYQMMIVRSTIDFPGGOWIEOHN---EKGRGSS	184
T.arundinaceum	MADLSIHYYTYTLDDSDRE--EAGTMAIWMEDLNARPOAHGTRVNDPIENVLRHYGCGYQMMIVRSTIDFPGGOWIEOHN---EKGRGSS	184
S.chartarum	MADLSIHYYTYTLDDSDRE--DEHPQMLTYEDDLOSGNPKHEFTMLVNEHFNVLRRHFGPFCOSANLIRSTIDFPGGOWIEOHN---EHGPGSF	175
M.roridum	MADLSIHYYTYTLDDSDRE--DEHNMLTFEDDLOAGREQAHEFTMLVNEHFNVLRRHFGPFCOSANLIRSTIDFPGGOWIEOHN---EHGPGSY	175
F.sporotrichioides	MADLSIHYYTYTLDDSKD--DEYPTMANYEDDLOAGREQAHEFTMLVNEHFNVLRRHFGPFCOSANLIRSTIDFPGGOWIEOHN---ECGPFGSH	175
G.zeae	MADLSIHYYTYTLDDSD--DEHPAMLYEDDLOAGREQAHEFTMLVNEHFNVLRRHFGPFCOSANLIRSTIDFPGGOWIEOHN---ECGPFGSD	175
N.fischeri	QVQVSYLSIIMLDDEISS--EESTOMLAETFDLQCKQPKHEFTMLVNAHLERLLRHYGSCAFNIMRCDEYFPGGOWIEOHN---ECGPFGAD	179
A.niger	QISGLTAVFSDIDQCADPEFRECISRSRVSFLGQSTTNLQIKGYNTLHDIVSHYEWAGDMIKRTNDFVSINIVEAEQTDGMVSESHK	173
mad6s6hy ytl 6DDs p 6 5 dl q h 5w l n p 66rH5g 5c n664sT D5f gcw6Eq n F g pg		
TbTRI5	DYEGFLRRINGLGHCVGSSIWPHILVDBEEHFLLEITTAQAQENNMWVNDLSFYKEMFAERDQTSIVNYYVECEGITDQADKLCKDIIRSS	279
T.arundinaceum	DYEGFLRRINGLGHCVGSSIWPHILVDBEEHFLLEITTAQAQENNMWVNDLSFYKEMFAERDQTSIVNYYVECEGITDQADKLCKDIIRSS	279
S.chartarum	DYEGFLRRMNGLGHCVGSLWPKENENBQEHFLLEITTAQAQENNMWVNDLSFYKEMFAERDQTSIVNYYVSEGITINQALEKLTQDTLQSS	270
M.roridum	DYEGFLRRMNGLGHCVGSLWPKELFDEQKHELEITTAQAQENNMWVNDLSFYKEMFAERDQTSIVNYYVQDEISITQALEKLTQDTLQSS	270
F.sporotrichioides	DYEGFLRRMNGLGHCVGASLWPKQENERSLFLLEITTAQAQENNMWVNDLSFYKEMFAERDQTSIVNYYVSEBISINEALEKLTQDTLQSS	270
G.zeae	DYEGFLRRMNGLGHCVGASLWPKELFDERKNFLLEITTAQAQENNMWVNDLSFYKEMFAERDQTSIVNYYVCHBITIDEALEKLTQDTLQSS	270
N.fischeri	HYEGFLRLNLCGSAVAGTIFBASKRDEQRLEAEMSVMQAQIDGFVALNDLSFYKEMD---QDEANLVITCTVDITNEQALQRLTDDTIHAC	272
A.niger	DEEGFLRQKSGICEYAFYFEGSDNG---LGDYFLLPDPAAGTISQINDVLSFYKESVLCNBPCTWVKQCTCVCKISSEGAAPRFRVDQQLG-S	263
d5P FLRr ng6Ghcv g 5P e e fle a6aq6enw6rw ND6 SFYKE rd lV n v I3 2Al l dt6 ss		
TbTRI5	BEIIQVPHQNDENMYEILTRTQGYLTWHLDDRYRLNEVYESAGD--DPVACKFKYAESRRVYGANDPARK-----CV	352
T.arundinaceum	BEIIQVPHQNDENMYEILTRTQGYLTWHLDDRYRLNEVYESAAGD--DPVACKFKYAESRRVYGANDPARK-----CV	352
S.chartarum	EEMMVESQKDERINDIECEMHGYITWHLDDRYRLNEVYESGTRDKDIQTEDAMKRAHYEQAFKVGAEATE-----AY	345
M.roridum	EEMMVESQKDERINDIECEMHGYITWHLDDRYRLNEVYESGTRMHETEDAMKRAHYEQAFKVGAEATE-----AF	345
F.sporotrichioides	KQVVAVESQKDEIQVNDIECEMHGYITWHLDDRYRLNEVYESKVKKEETEDAQKFCFYEQANVCAPSPET-----AY	345
G.zeae	KQVVAVESQKDEIQVNDIECEMHGYITWHLDDRYRLNEVYESKVKQDQTKDAKFCFYEQANVCAPSPET-----AY	345
N.fischeri	VRULELQKNDHDMIAIRGETHGYATWHLDARYRLNEVYESD--REDLQSGAGREYEDKIDVGVNDVEETCQVQGFVDPGNPTGSEIQAY	365
A.niger	IRRLRAASEGRLKQVNEFINSYPLFLHACRYKLLGEGS-----THGQCKETAGN-----	318
6 f dklp 6 t6 F6 GY t5H6cd RY4L 2 y a 5 k5 a vGa		
TbTRI5	ES-VTELCEMAKQSAGRSWDFGKGIASKISSVAQ-----	388
T.arundinaceum	ES-VTELCEMAKQSAGRSWDFGKGIANKISSVAQ-----	388
S.chartarum	ET-VVERLEQRKAEQAEQARDEQAALANPE--KAQAQVVL-----	383
M.roridum	ET-VAERIEVRLAEKAADQGAQVTSARPAVPQAQAEVLA-----	385
F.sporotrichioides	EP-VAQLANVR-SK-DVKEVQKPFSSIELVE-----	374
G.zeae	EQ-VAHLANVR-AKGDVKEAQKPFSSIELVE-----	375
N.fischeri	ETNAFAFSVDTLRHHNMDYVGSSILGLPEWVTRYLRGKLPQGNAGR	412
A.niger	-----	-
p v 1		

Figura 18. Alineamiento y comparación de la secuencia de aminoácidos de TbTRI5 de *T. brevicompactum* IBT 40841 con trichodieno sintasas descritas en diversos hongos. *Trichoderma arundinaceum* (AJ784992), *Fusarium sporotrichioides* (AY130293), *Gibberella zeae* (EF661664), *Myrothecium roridum* (AF009416), *Stachybotrys chartarum* (AF053926), *Neosartorya fischeri* (XM_001266525) y *Aspergillus niger* (XM_001389926). Las tres regiones conservadas descritas en la bibliografía aparecen marcadas en recuadros rojos. Los aminoácidos conservados en todas las trichodieno sintasas que forman parte del centro activo de la proteína aparecen marcados con un asterisco (*). El alineamiento se llevó a cabo con el programa *Clustal X* (Thompson y col., 1994).

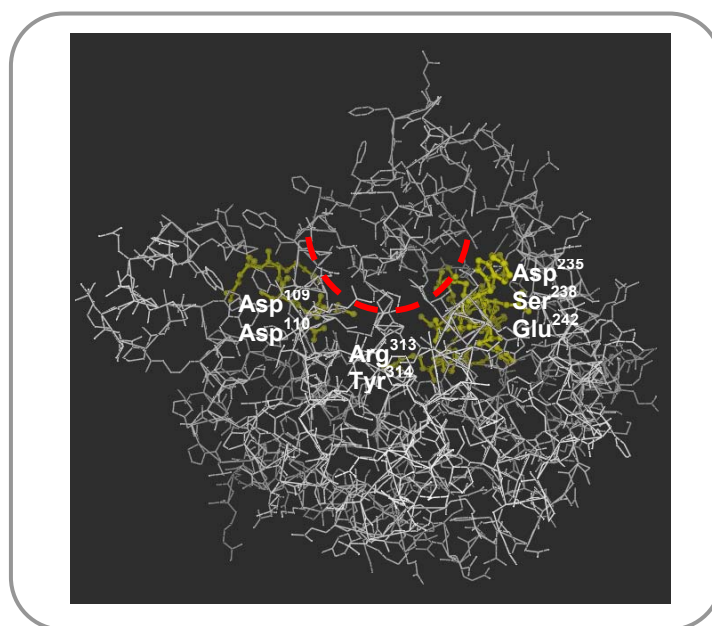


Figura 19. Modelo teórico de la estructura tridimensional de la proteína TbTRI5 utilizando el programa DeepView-Swiss-PdbViewer (ESyPred3D v1.0). En amarillo se representan los motivos conservados en las diferentes especies de hongos, dentro de los cuales se señalan los aminoácidos que constituyen el sitio catalítico de la enzima. La hendidura que forma el sitio catalítico de la enzima está representada con una línea roja discontinua.

El destino celular más probable de TbTRI5 se simuló mediante el uso del programa PSORT II (Nakai y Horton, 1999) que le asignó una ubicación citoplasmática, con una probabilidad del 65,2%.

2.3. Análisis filogenético

Se llevó a cabo un análisis filogenético, tras un alineamiento de *Tbtri5* con otras secuencias de genes que codifican trichodieno sintasas depositadas en la base de datos *GenBank*. En los alineamientos se incluyeron 7 genes de ascomycetos y uno de planta. En la Figura 20 se muestra el árbol filogenético *neighbour-joining* (NJ), basado en distancias, y valores de un análisis *bootstrap* procedentes de 1000 repeticiones. En el árbol se observan dos cuerpos principales, uno donde se sitúan las secuencias de ascomycetos y otro donde se sitúa la secuencia de planta. Además, la secuencia de *A. niger*, que codifica una hipotética trichodieno sintasa, quedó separada de la del resto de ascomycetos. La secuencia de *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841 se agrupó con la de *tri5* de *T. arundianceum* (Gallo y col., 2004) formando un subgrupo soportado por un valor *bootstrap* del 100%.

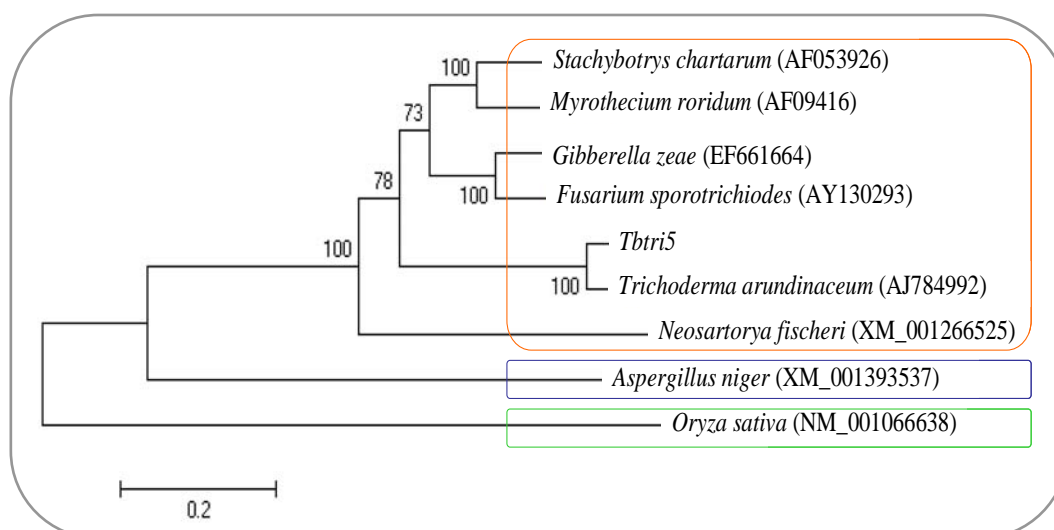


Figura 20. Árbol *neighbour-joining* del gen *tri5*. El gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841 se alineó con 7 secuencias de genes que codifican trichodieno sintasas (6 de ascomicetos, en naranja, y 1 de planta, en verde) y 1 secuencia de otro ascomiceto, *A. niger*, que codifica una hipotética trichodieno sintasa (XM_001393537) (en azul). El alineamiento se llevó a cabo con el programa *Clustal X* (Thompson y col., 1994) y el árbol NJ se obtuvo utilizando el programa *MEGA V4* (Kumar y col., 2008). Los números en las ramas indican los valores *bootstrap* procedentes de un análisis de 1000 repeticiones. A la derecha de cada especie aparece su número de acceso en la base de datos *GeneBank*. La barra representa 20 sustituciones por cada 100 nucleótidos.

2.4. Estudio de la expresión del gen *Tbtri5*

El patrón de expresión del gen *Tbtri5* se analizó mediante *Real-time* PCR. Para ello se utilizaron 0,5 µL de ADNc obtenidos a partir de ARN total extraído de micelio de *T. brevicompactum* IBT 40841 crecido en MM, sin glucosa, durante 1, 3 ó 7 días, bajo distintas condiciones de cultivo, tal y como se describe en el apartado 4.1.3 de Materiales y Métodos. Se utilizaron condiciones de inducción que simulaban situaciones de estrés abiótico como: 15°C de temperatura, valores de 4 ó 8 de pH y diferentes valores de humedad utilizando para ello 0,025, 0,1 ó 1% de glicerol. También se cultivó *T. brevicompactum* IBT 40841 bajo diferentes condiciones de estrés oxidativo: 0,2 ó 0,5 mM de H₂O₂, ó 0,2 ó 0,5 mM de paraquat; o estrés nutricional: 1 ó 2% de sacarosa. Todas estas condiciones de crecimiento fueron en ausencia de glucosa, excepto cuando se analizó su presencia, incluyéndola al 1 ó 2% en el medio de cultivo. La amplificación del ADNc se llevó a cabo con los oligos Tri5Tb-5 y tri5-3 y como control de carga el gen de la β-tubulina.

Las condiciones en las que se llevaron a cabo las amplificaciones por *Real-time* PCR fueron idénticas en todos los casos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21.

Los mayores niveles de transcrito del gen *Tbtri5* se detectaron en cultivos de 3 días de la cepa IBT 40841 en presencia de 0,2 ó 0,5 mM de H₂O₂, 2% de glucosa y 0,1% de glicerol.

También se pudo observar un pequeño incremento en los niveles del transcrito tras cultivar el hongo durante 1 día a pH 8; durante 3 días en presencia de sacarosa 2% o glicerol 1%, o durante 7 días en presencia de glucosa 1% o de paraquat 0,2 ó 0,5 mM. En el resto de las condiciones de crecimiento analizadas no se observó incremento en los niveles de transcrito (Figura 21).

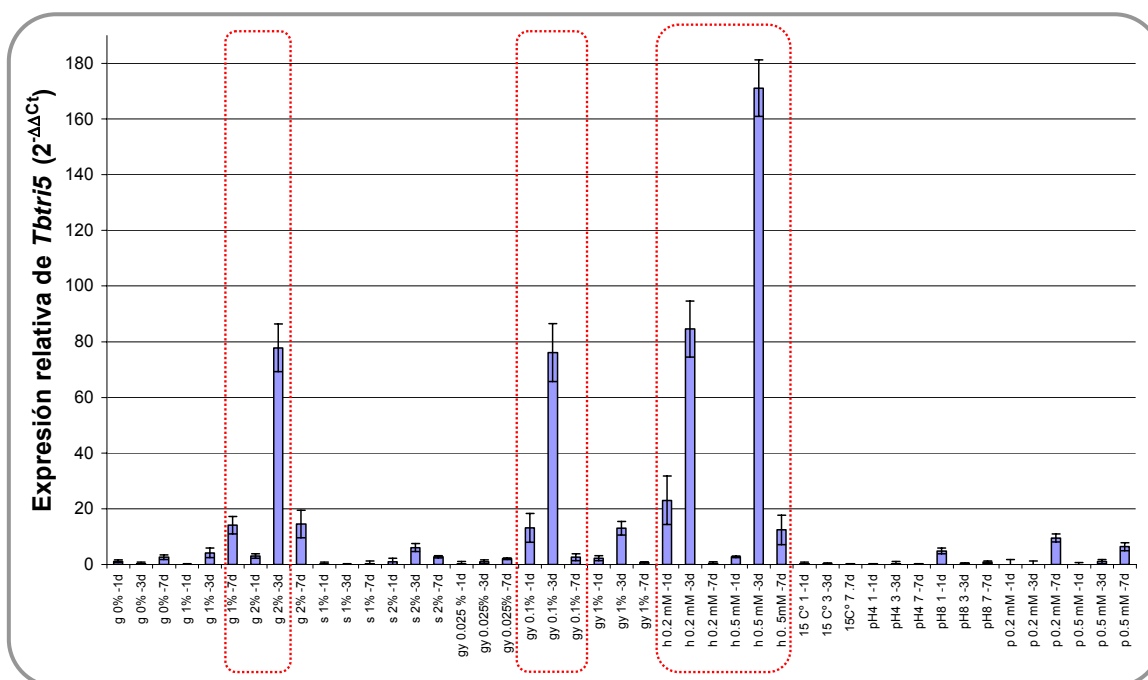


Figura 21. Análisis de expresión del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841 mediante *Real-time* PCR. El experimento se realizó con 0,5 μ L de ADNc obtenido a partir de ARN total extraído de micelio de la cepa IBT 40841 crecida en MM (Penttilä y col., 1987) bajo las siguientes condiciones: glucosa (g) 0, 1 ó 2%; sacarosa (s) 1 ó 2%, glicerol (gy) 0,025, 0,1 ó 1%; H_2O_2 (h) 0,2 ó 0,5 mM; 15°C; pH 4 u 8; y paraquat (p) 0,2 ó 0,5 mM. Los micelios se recogieron a 1, 3 ó 7 días de crecimiento de la cepa IBT 40841. Como control de carga se utilizó el gen de la β -tubulina. Se tomó como valor de la condición basal $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$.

Además, se analizó cómo la presencia de un agente con características antioxidantes como puede ser el ácido ferúlico o el tirosol, afectaba al crecimiento del hongo y a la expresión del gen *Tbtri5*. El efecto sobre el crecimiento se analizó tras cultivar *T. brevicompactum* IBT 40841 durante 4 días a 28°C en PDA al que se añadieron, o no, 0,25, 1 ó 5 mM de ácido ferúlico o de tirosol. El nivel de expresión del gen *Tbtri5* se analizó mediante *Real-time* PCR y se utilizaron 0,5 μ L de ADNc obtenido a partir de ARN total extraído de micelio de *T. brevicompactum* IBT 40841 crecido en MM, sin glucosa, durante 1, 3 ó 7 días, en presencia de 0, 0,25, 1 ó 5 mM de ácido ferúlico o de tirosol. La amplificación del ADNc se llevó a cabo con los oligos Tri5Tb-5 y tri5-3 y como control de carga se utilizó el gen de la β -tubulina.

El crecimiento de la cepa IBT 40841 fue similar en ausencia de ácido ferúlico como cuando éste estuvo presente en el medio a las concentraciones de 0,25 ó 1 mM. Sin embargo,

en los medios de cultivos suplementados con ácido ferúlico a concentraciones de 5 mM se observó una completa inhibición del crecimiento del hongo. Por otro lado, no se observó ningún efecto sobre el crecimiento del hongo, en comparación con los cultivos control, cuando el medio se suplementó con tirosol a cualquiera de las concentraciones ensayadas (Figura 22).

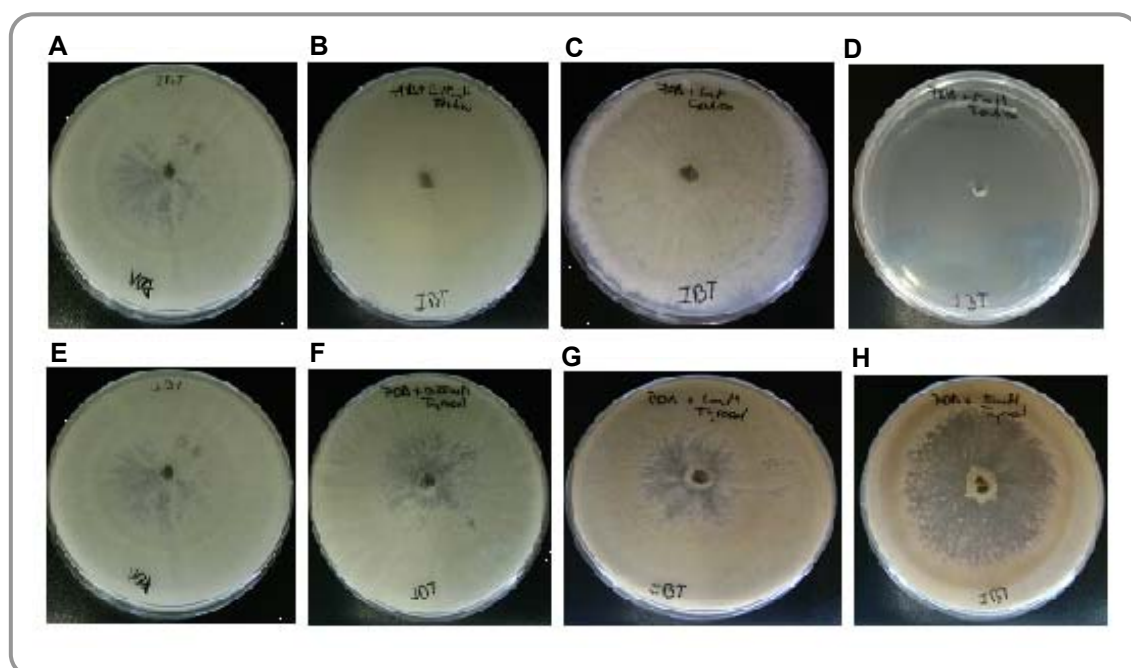


Figura 22. Crecimiento de la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 en medio de cultivo PDA suplementado, o no, con ácido ferúlico o tirosol. Control de crecimiento (A y E), ácido ferúlico 0,25 mM (B), ácido ferúlico 1 mM (C), ácido ferúlico 5 mM (D), tirosol 0,25 mM (F), tirosol 1 mM (G), tirosol 5 mM (H).

Los mayores niveles de transcrito del gen *Tbtri5* se detectaron tras crecer el hongo durante 1 día en presencia de 0,25 mM de ácido ferúlico o de tirosol (Figura 23). Para todas las condiciones ensayadas, se observa cómo los niveles de expresión disminuyen con el tiempo (3 y 7 días de crecimiento). Y, también, como disminuye la expresión del gen cuando se aumenta la concretación de ácido ferúlico o de tirosol hasta 1 ó 5 mM. A igualdad de concentración y de tiempo, se observa cómo el ácido ferúlico afecta en mayor medida a la expresión del gen que el tirosol.

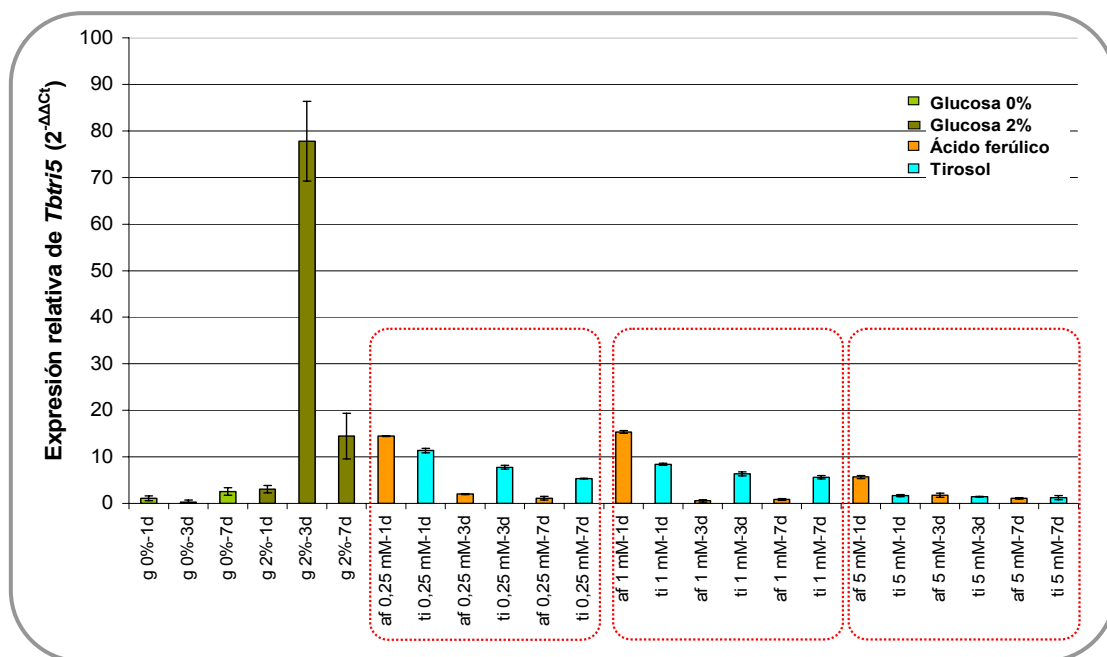


Figura 23. Análisis de expresión del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841, en presencia o no de glucosa, o de un agente antioxidante, mediante *Real-time PCR*. El experimento se realizó con 0,5 μ L de ADNc obtenido a partir de ARN total extraído de micelio de la cepa IBT 40841 crecida en MM (Penttilä y col., 1987) bajo las siguientes condiciones: 0% glucosa (g) 3 días (condición basal); 2% glucosa (g); 0,25, 1 ó 5 mM de ácido ferúlico (af) o de tirosol (ti). Los micelios se recogieron a 1, 3 ó 7 días de crecimiento de la cepa IBT 40841. Como control de carga se utilizó el gen de la β -tubulina. Se tomó como valor de la condición basal $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$.

2.5. Análisis Southern de *Tbtri5*. Presencia en otras cepas de *Trichoderma*

Se realizó un experimento tipo *Southern* para determinar el número de copias del gen *Tbtri5* en el genoma de *T. brevicompactum* IBT 40841. Se utilizaron 10 μ g de ADN genómico, obtenidos según se recoge en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos, y se digirieron con la enzima *Bam*HI. Como sonda se empleó un fragmento de 650 pb del gen, amplificado mediante PCR con los oligos Tri5Tb-5 y tri5-3, marcado con digoxigenina (Figura 24).

Tras hibridar y lavar la membrana, en condiciones restrictivas (65°C), se observó una única banda con el ADN de la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 digerido con *Bam*HI, sin diana nucleotídica dentro de la sonda utilizada. Este resultado sugiere la presencia de una única copia del gen *Tbtri5* en la cepa silvestre.

Además, mediante *Southern* se analizó la presencia de un gen homólogo en otras especies del género *Trichoderma*. Se empleó ADN genómico de las cepas *T. atroviride* T11, *T. asperellum* T25, *T. harziaunum* T34, *T. harzianum* T22, *T. longibrachiatum* T52 y *T. virens* T59, digeridos con las enzimas *Bam*HI o *Xho*I. El protocolo de extracción de ADN genómico se recoge en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos. Como sonda se empleó un fragmento de

650 pb del gen, amplificado mediante PCR con los oligos Tri5Tb-5 y tri5-3, marcado con digoxigenina.

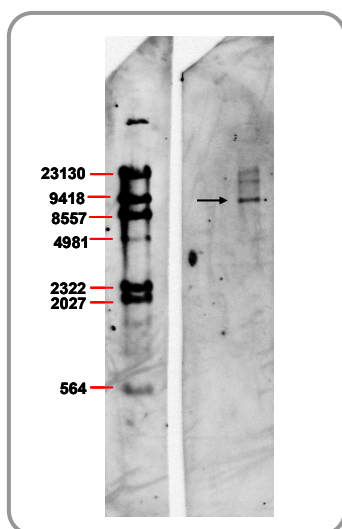


Figura 24. Análisis tipo Southern del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841. El ADN se digirió con la enzima *Bam*HI, y la hibridación se realizó en condiciones restrictivas usando un fragmento de 650 pb del gen *Tbtri5* como sonda. La presencia del gen endógeno *Tbtri5* se indica con una flecha negra. A la izquierda se representa el marcador de tamaños moleculares de ADN λ /*Hind*III (Roche Applied Science).

Tras hibridar y lavar la membrana, en condiciones restrictivas (65°C), se observó una única banda en los carriles correspondientes al ADN de las cepas *T. virens* T59, *T. longibrachiatum* T52, *T. harzianum* T34, *T. harzianum* T22 y *T. atroviride* T11 digeridos con *Xho*I o *Bam*HI, sin diana nucleotídica dentro de la sonda utilizada. Se observó una banda de hibridación muy débil en los carriles que contenían el ADN de *T. asperellum* T25 digeridos con *Xho*I o *Bam*HI. Este resultado sugiere la presencia de un gen homólogo a *Tbtri5* en todas las cepas analizadas (Figura 25).

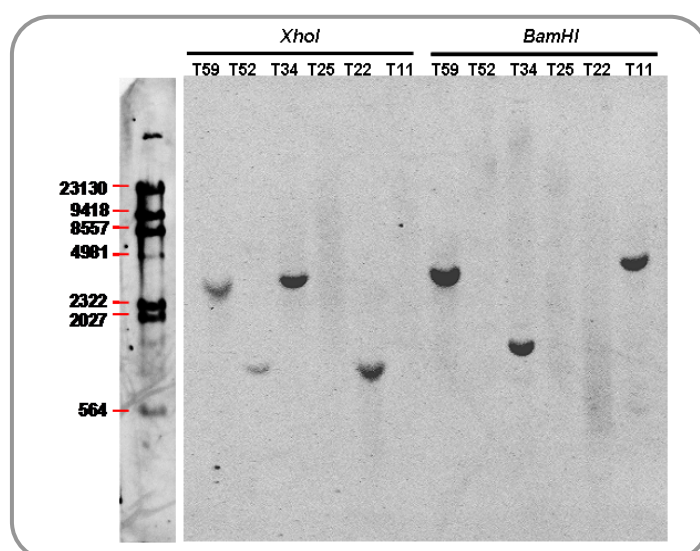


Figura 25. Análisis tipo Southern del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841 en las cepas *T. virens* T59, *T. longibrachiatum* T52, *T. harzianum* T34, *T. asperellum* T25, *T. harzianum* T22 y *T. atroviride* T11. El ADN se digirió con las enzimas *Bam*HI o *Xho*I, y la hibridación se realizó en condiciones restrictivas usando 650 pb del gen *Tbtri5* como sonda. A la izquierda se representa el marcador de tamaños moleculares de ADN λ /*Hind*III (Roche Applied Science).

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *Tbtri5* DE *T. brevicompactum* IBT 40841

El análisis funcional del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841 se realizó mediante una sobreexpresión homóloga.

3.1. Obtención de cepas de *T. brevicompactum* IBT 40841 que sobreexpresan el gen *Tbtri5*

Para obtener cepas de *T. brevicompactum* IBT 40841 que sobreexpresan el gen que codifica la proteína TbTRI5 de esta misma cepa, se llevó a cabo una transformación con *A. tumefaciens* AGL1, que previamente se había transformado por electroporación con el plásmido pURSPT5. De manera resumida, se utilizó el plásmido pAN52-1 para insertar el gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841, aislado por PCR de la propia cepa, y sacar el *cassette* de expresión (denominado SPT5) que, a su vez, se clonó en el vector pUR5750, dando lugar al plásmido pURSPT5, que se utilizó para transformar la cepa de *A. tumefaciens* AGL1. El proceso detallado de la construcción de este plásmido se recoge en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos.

La transformación de *T. brevicompactum* IBT 40841 con *A. tumefaciens* AGL1 se realizó según los protocolos detallados en el apartado 7.2. Inicialmente, los 45 transformantes obtenidos se confirmaron tras sucesivas rondas de crecimiento, en medio TSA selectivo (100 µg/mL de higromicina y cefotaxima 300 µg/mL, para eliminar las células de *A. tumefaciens*) y medio TSA no selectivo (sin antibiótico). Y, se seleccionaron diez transformantes para los estudios posteriores.

3.2. Caracterización de las cepas transformadas con pURSPT5

3.2.1. Comprobación y selección de los transformantes

En primer lugar, se analizó la integración del vector pURSPT5 en el genoma de *T. brevicompactum* IBT 40841. Para ello, se extrajo el ADN genómico de la cepa IBT 40841 y de los diez transformantes, denominados Tb1tri5, Tb25tri5, Tb30tri5, Tb32tri5, Tb37tri5, Tb38tri5, Tb39tri5, Tb40tri5, Tb41tri5 y Tb43tri5, y se realizó una PCR para comprobar si llevaban el *cassette* de expresión. Se utilizaron los oligonucleótidos ble y tri5-3, que amplificaron un fragmento de 720 pb correspondiente a: parte del fragmento del gen *Tbtri5* y parte del gen *hph* que confiere la resistencia a higromicina. La PCR resultó positiva para nueve de los diez transformantes (Figura 26), es decir, para todos excepto para la cepa Tb37tri5.

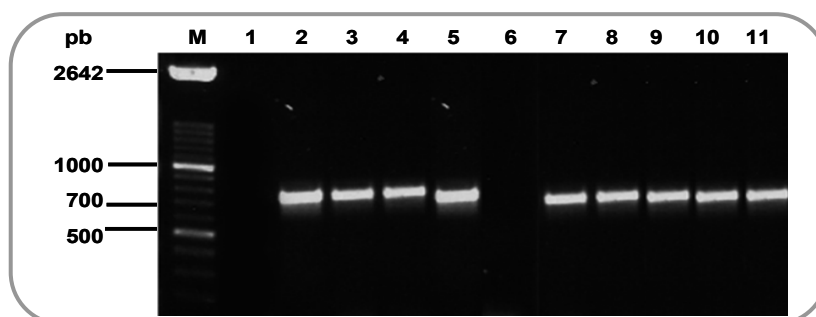


Figura 26. Productos de PCR obtenidos a partir de amplificaciones de ADN genómico de *T. brevicompactum* IBT 40841 (carril 1) y de diez cepas transformantes (carriles 2-11) con los oligos *ble* y *tri5-3*. M: marcador XIV DNA ladder (Roche Applied Science).

Con el objeto de reducir el número de transformantes con los que llevar a cabo los siguientes estudios, se analizó su actividad antimicrobiana frente a las levaduras *S. cerevisiae* CECT 1383 y *K. marxianus* CECT 1018, como se indica en el apartado 12.1 de Materiales y Métodos. En este bioensayo se seleccionó el transformante Tb41tri5, el cual mostró mayor actividad que la cepa silvestre IBT 40841. Además de este transformante, se seleccionaron el Tb38tri5 y Tb40tri5 que mostraron una actividad similar a aquella observada para la cepa silvestre.

Para analizar la actividad antilevadura se cultivaron los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, y la cepa silvestre IBT 40841 en PDB durante 14 días. Como se muestra en la Figura 27, el transformante Tb41tri5 mostraba entre un 50-62% más actividad frente a *S. cerevisiae* CECT 1383 que la cepa silvestre (Figura 27 A) y entre un 60-80% más frente a *K. marxianus* CECT 1018 (Figura 27 B). Mientras que los transformantes Tb38tri5 y Tb40tri5 mostraban actividades antilevadura similares a las observadas para la cepa silvestre (Figura 27 A y B).

3.2.2. Confirmación de los transformantes: análisis tipo *Southern*

Una vez seleccionados los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, que se incluirían en otros estudios, se realizaron análisis tipo *Southern* para conocer el número de copias del *cassette* de transformación que se habían integrado en el genoma de esas cepas. Por un lado, se digirieron 10 µg de ADN de la cepa silvestre, de la cepa transformada con el plásmido vacío y de los tres transformantes seleccionados con la enzima *Bam*HI, que corta una vez en el gen *Tbtri5*, y se hibridaron con un fragmento del gen *Tbtri5* (650 bp), marcado con digoxigenina. Las bandas adicionales observadas con el ADN de las tres cepas transformantes y que no estaban presentes en los carriles donde se incluyó ADN de la cepa silvestre o ADN de la cepa transformada con el plásmido vacío confirmaban que esas cepas eran transformantes y que, en su genoma, se había integrado una copia del *cassette* de transformación (Figura 28 A). Por

otro lado, en hibridaciones realizadas con ADN de la cepa silvestre y de los tres transformantes, digerido con *Bgl*II o *Bam*HI e hibridado con el gen *hph* que codifica la higromicina, que no tiene diana para ninguna de las dos enzimas citadas, se detectaron varias señales en los carriles donde se incluyó el ADN de los transformantes que no estaban presentes en el carril donde se incluyó el ADN de la cepa silvestre (Figura 28 B y C). Aunque se observaron varias señales de hibridación con el ADN de las cepas transformantes, algunas de ellas podrían ser debidas a sobredigestiones ya que los tamaños de banda esperados eran de 4109 pb, con la enzima *Bgl*II, y 3937 pb, con *Bam*HI.

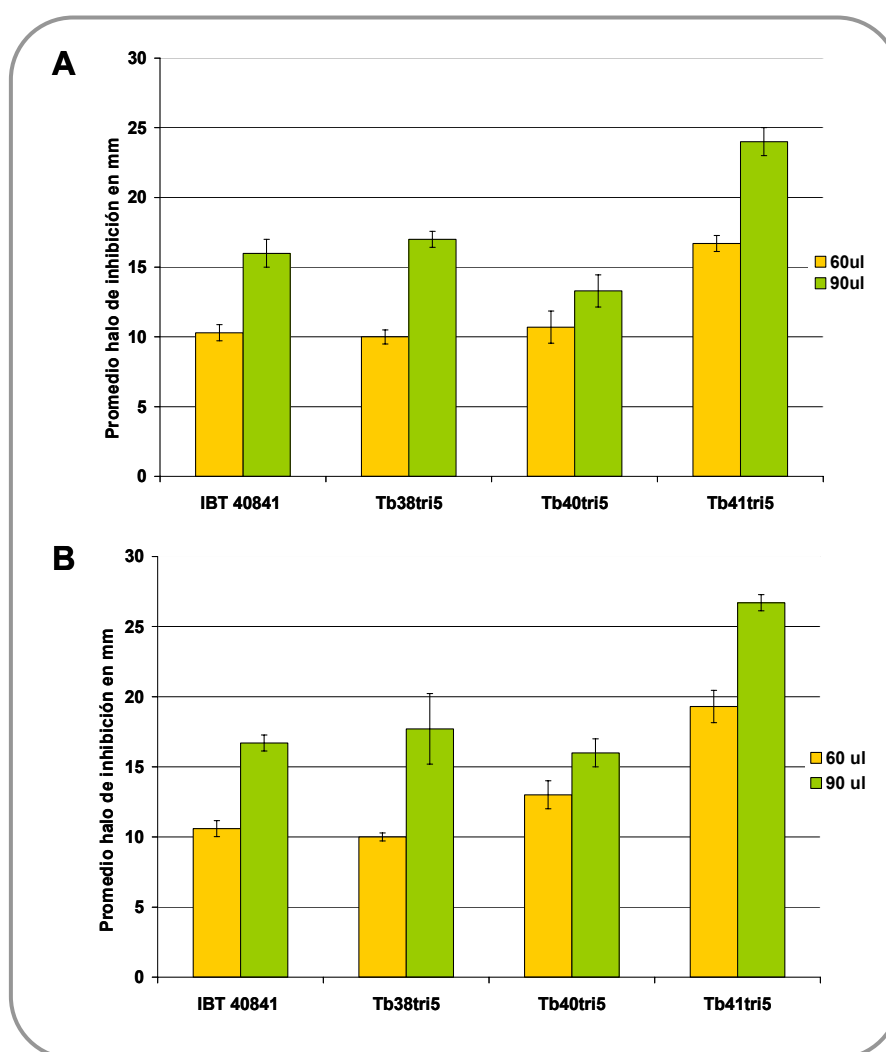


Figura 27. Bioensayo de actividad de la cepa silvestre IBT 40841 y los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5 frente a las levaduras *S. cerevisiae* CECT 1383 (A) y *K. marxianus* CECT 1018 (B). Los resultados se expresan como diámetro en mm de los halos de inhibición formados. Las cepas se crecieron en medio PDB durante 14 días, y en el ensayo se incluyeron 60 ó 90 µL de sobrenadante de cultivo.

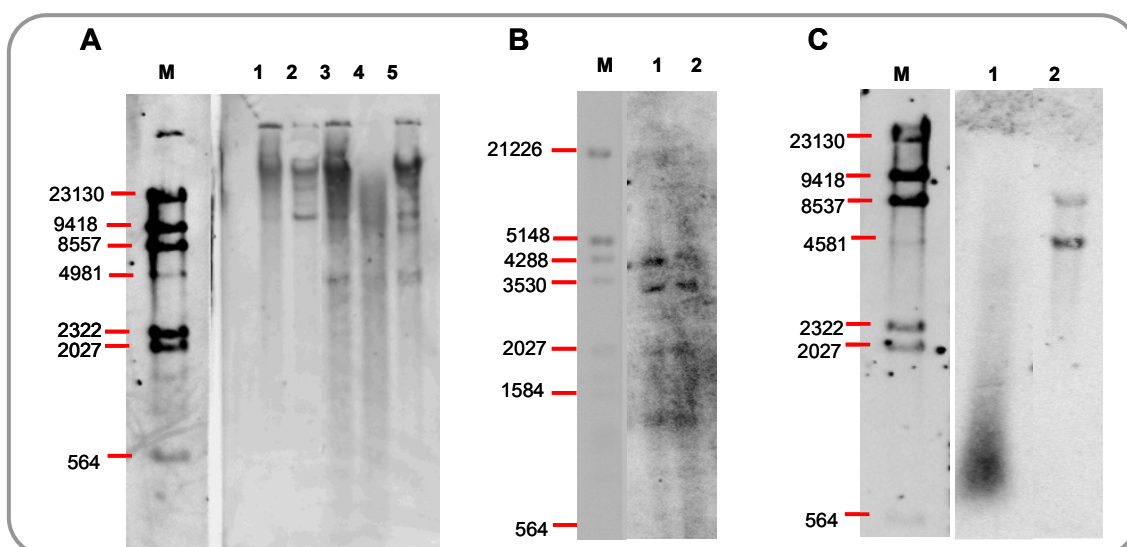


Figura 28. Análisis tipo Southern de transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841. (A) ADN de cepa silvestre (carril 1), cepa transformada con el plásmido vacío (carril 2), Tb38tri5 (carril 3), Tb40tri5 (carril 4) y Tb41tri5 (carril 5) digerido con *Bam*HI e hibridado, en condiciones restrictivas, con un fragmento del gen *Tbtri5*. Marcador (M): λ HindIII. (B) ADN de transformantes Tb38tri5 (carril 1) y Tb40tri5 (carril 2) digerido con la enzima *Bgl*II. Marcador (M): λ EcoRI/*Hind*III. Se utilizaron 10 μ g de ADN y se hibridaron, en condiciones restrictivas, con el gen *hph* que codifica la higromicina. (C) ADN de cepa silvestre (carril 1) y del transformante Tb41tri5 (carril 2) digerido con *Bam*HI. Marcador (M): λ HindIII. Se utilizaron 10 μ g de ADN y se hibridaron, en condiciones restrictivas, con el gen *hph* que codifica la higromicina.

3.2.3. Análisis de la expresión de *Tbtri5* en los transformantes seleccionados

Con objeto de conocer si la introducción de copias extra del gen *Tbtri5* en el genoma de *T. brevicompactum* IBT 40841 incrementaba los niveles del transcrito de *Tbtri5*, éstos se midieron mediante *Real-time* PCR (como se indica en el apartado 9.3.3 de Materiales y Métodos). Cepa silvestre y transformantes (Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5) se cultivaron, durante 3 días, bajo aquellas condiciones de crecimiento donde más expresión del gen se había detectado cuando se analizó la expresión en la cepa silvestre: MM (Penttilä y col., 1987), sin glucosa, suplementado con glucosa al 2% o suplementado con H_2O_2 0,2 mM.

El ARN total se retrotranscribió utilizando oligo (dT)₁₅ (como se indica en el apartado 9.3.2 de Materiales y Métodos). El ADNc, así generado, se utilizó como molde en diferentes reacciones de PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos Tri5Tb-5 y tri5-3, diseñados en la zona inicial y central del gen; y como control interno se utilizó el gen que codifica la β -tubulina, usando los oligos Tub-r y Tub-f. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 29.

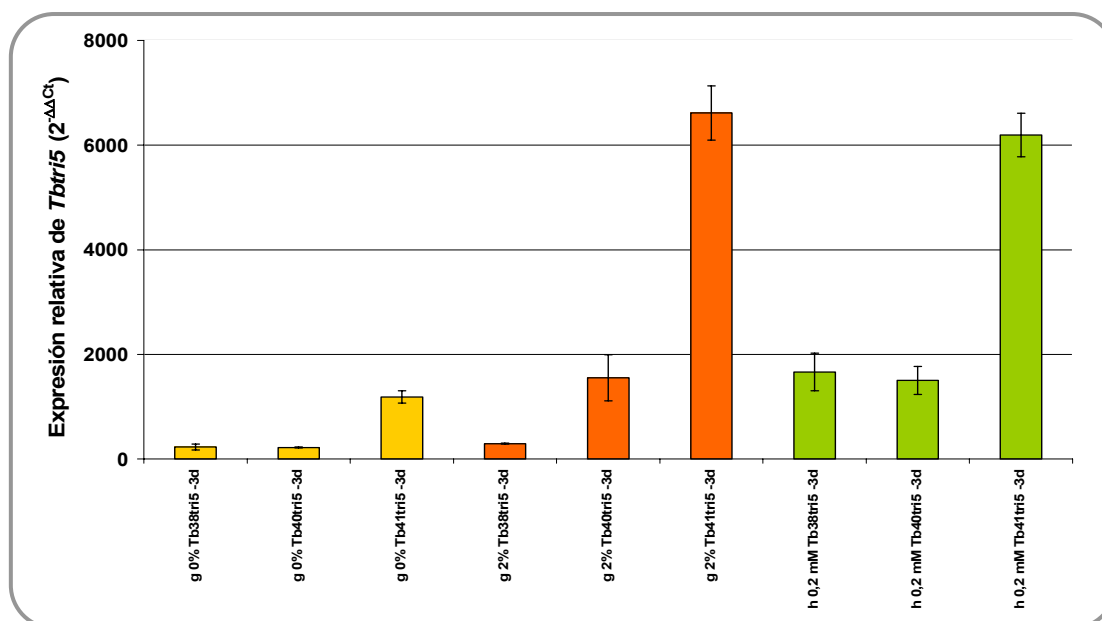


Figura 29. Expresión del gen *Tbtri5*, mediante *Real-time* PCR, en tres transformantes que sobreexpresan el gen (*Tb38tri5*, *Tb40tri5* y *Tb41tri5*). Las cepas se incubaron durante 3 días en MM (Penttilä y col., 1987), sin glucosa (g), suplementado con glucosa (g) al 2% o suplementado con H_2O_2 (h) 0,2 mM. Como control de carga se utilizó el gen de la β -tubulina. Como condición basal se utilizaron los niveles detectados en la cepa silvestre, IBT 40841, incubada bajo idénticas condiciones. Se tomó como valor de la condición basal $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$.

Los tres transformantes *Tb38tri5*, *Tb40tri5* y *Tb41tri5* mostraron mayores niveles de expresión del gen *Tbtri5* que la cepa silvestre IBT 40841, bajo las tres condiciones de cultivo ensayadas. Además, fueron especialmente altos los niveles de transcrito detectados en el transformante *Tb41tri5* (Figura 29).

Por otro lado, se estudió cómo afectaba al crecimiento de los transformantes la presencia de un agente antioxidante en el medio de cultivo. Teniendo en cuenta los resultados que habíamos obtenido para la cepa silvestre, los transformantes *Tb38tri5*, *Tb40tri5* y *Tb41tri5* se incubaron, durante 3 días, en medio PDA suplementado con ácido ferúlico o tirosol, 0,25, 1 ó 5 mM. El crecimiento de la cepa silvestre no se inhibía en presencia de 0,25 ó 1 mM de ácido ferúlico, y lo hacía en un 100% en presencia de 5 mM de este ácido. Sin embargo, el crecimiento de los tres transformantes se inhibía en un 50% en presencia de 1 mM de ácido ferúlico. En presencia de 0,25 ó 5 mM de ácido ferúlico el crecimiento era similar en la cepa silvestre y los tres transformantes. No se apreciaron diferencias de crecimiento entre cepa silvestre y transformantes en presencia de 0,25, 1 ó 5 mM de tirosol.

También se analizó en los tres transformantes, cómo afectaba a la expresión del gen *Tbtri5* cuando se crecían durante 1 ó 3 días en presencia de concentraciones de 0,25 ó 5 mM de tirosol (Sección 4.1.3 de Materiales y Métodos). En la Figura 30 se muestran los niveles de transcrito detectados mediante *Real-time* PCR en los 3 transformantes analizados respecto a

los detectados en la cepa silvestre. De forma general para los tres transformantes, se observa que los niveles de *Tbtri5* disminuyen a medida que aumenta la cantidad de tirosol en el medio de cultivo; y, a su vez, esa disminución en la expresión del gen se observa tanto en cultivos de 1 como de 3 días.

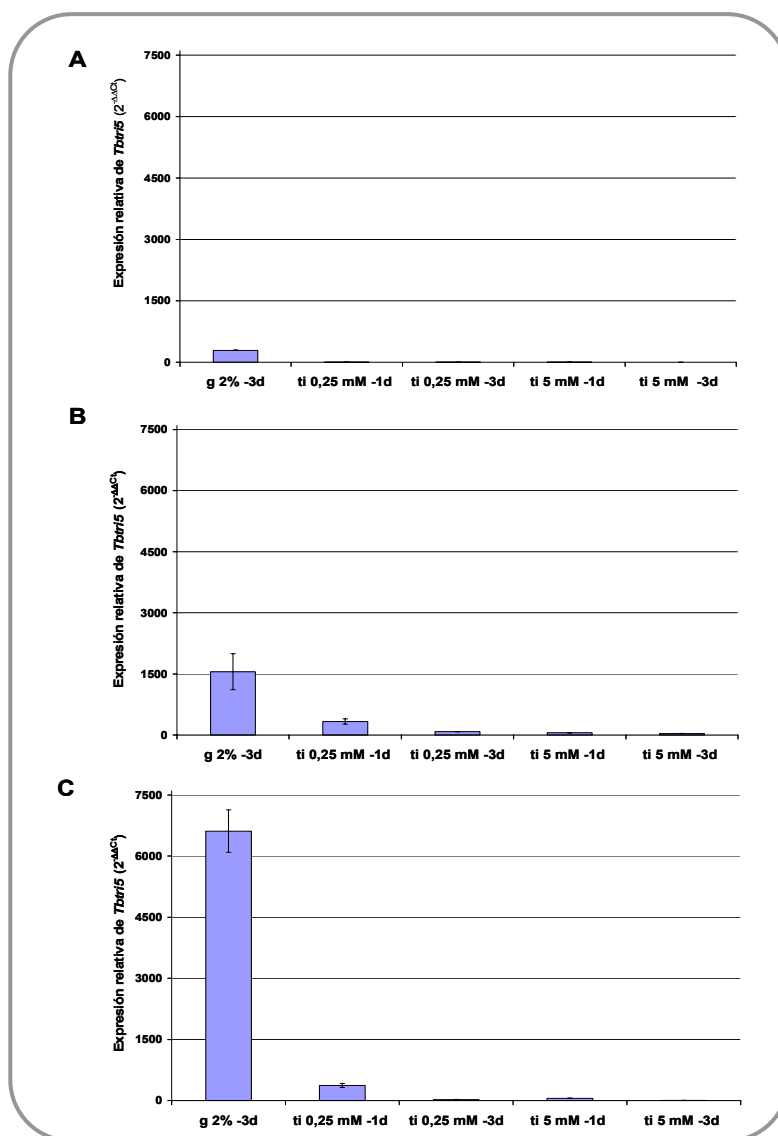


Figura 30. Expresión del gen *Tbtri5* en los transformantes Tb38tri5 (A), Tb40tri5 (B) y Tb41tri5 (C) crecidos en presencia glucosa (g) al 2% o de tirosol (ti). Los hongos se incubaron durante 1 ó 3 días en presencia de 0,25 ó 5 mM de tirosol. Como control de carga se utilizó el gen de la β -tubulina. Como condición basal se utilizaron los niveles detectados en la cepa silvestre, IBT 40841, incubada bajo idénticas condiciones. Se tomó como valor de la condición basal $2^{-\Delta\Delta Ct}=1$.

3.2.4. Influencia de la sobreexpresión de *Tbtri5* en la producción de metabolitos secundarios

Con objeto de conocer el efecto que tenía la sobreexpresión del gen *Tbtri5* en el metaboloma de *T. brevicompactum* IBT 40841, se analizó la producción de metabolitos secundarios en la cepa silvestre IBT 40841 y en el transformante Tb41tri5, por ser éste el

transformante en el que se detectaron los mayores niveles del transcrito de este gen. Este estudio se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Prof. Isidro G. Collado (Universidad de Cádiz).

La cepa silvestre y el transformante se incubaron, durante 14 días, bajo las condiciones descritas en el apartado 11.1 de Materiales y Métodos. Pasado este tiempo se filtraron los medios para eliminar el micelio y se realizó la extracción del sobrenadante con acetona. Los extractos acetónicos se concentraron a vacío en rotavapor, eliminando la acetona, y el medio acuoso se sometió a extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Las muestras se evaporaron a sequedad y los pesos de los extractos obtenidos fueron de 70 mg tanto para la cepa silvestre como para el transformante Tb41tri5.

A continuación, los extractos de ambas cepas, silvestre y Tb41tri5, se estudiaron comparativamente mediante cromatografía de capa fina con diferentes reveladores. Para la detección de metabolitos se utilizó luz UV, observándose mejores resultados cuando se usaron los reveladores de ácido fosfomolibdico o vainillina. En este sentido, los resultados mostraron un patrón de manchas similares, aunque en el extracto correspondiente al transformante Tb41tri5 se observaron manchas más intensas, lo cual implica una mayor concentración de metabolitos en el extracto de esta cepa (Figura 31).

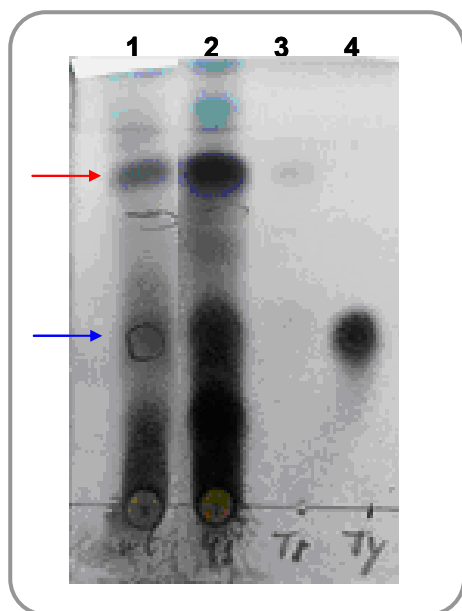


Figura 31. Cromatografía de capa fina de los extractos de la cepa silvestre *T. brevicompactum* IBT 40841 y del transformante Tb41tri5 utilizando vainillina como revelador. Extracto de IBT40841 (1), extracto de Tb41tri5 (2), control de trichodermina (3), control de tirosol (4). Las flechas roja y azul señalan las manchas correspondientes a trichodermina y tirosol, respectivamente

Con objeto de aislar esos productos diferenciales, los crudos de fermentación se percolaron mediante cromatografía en columna. La elución se realizó con fases móviles, usando como eluyentes mezclas de acetato de etilo/hexano de polaridad creciente desde un 5% a un 100% en acetato y finalmente con metanol.

Las tres fracciones obtenidas se purificaron mediante HPLC, utilizando una columna semipreparativa o analítica, flujo de 1,0 mL/minuto y una mezcla de hexano/acetato de etilo al 40% como eluyente. Los metabolitos aislados a partir de 70 mg de extractos de ambas cepas y las cantidades obtenidas de cada uno de ellos se describen en la Tabla 9, observándose un incremento significativo en la producción de trichodermina en la cepa Tb41tri5 respecto a la cantidad de este metabolito que se aisló en la cepa silvestre.

Tabla 9. Metabolitos purificados por HPLC a partir de cultivos de la cepa silvestre IBT 40841 y del transformante Tb41tri5 en medio PDA durante 14 días de incubación.

Metabolitos	IBT 40841	Tb41tri5
Trichodermina	7,91 mg	22,63 mg
Tirosol	3,52 mg	5,32 mg
Hidroxitirosol	2,3 mg	0,04 mg
Total extracto	70 mg	70 mg

En el estudio RMN se observó que estos tres compuestos presentaron constantes físicas y espectroscópicas idénticas a los correspondientes espectros descritos en la bibliografía para la trichodermina y los feniletanoles, tirosol e hidroxitirosol.

En la Figura 32 se representan los espectros RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de la trichodermina. Igualmente, en las Figuras 33 y 34 se representan los espectros RMN- ^1H y RMN- ^{13}C del tirosol e hidroxitirosol, respectivamente. Los datos correspondientes a las señales espectrales RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de cada una de estas tres moléculas se detallan en los paneles C de cada una de éstas tres figuras.

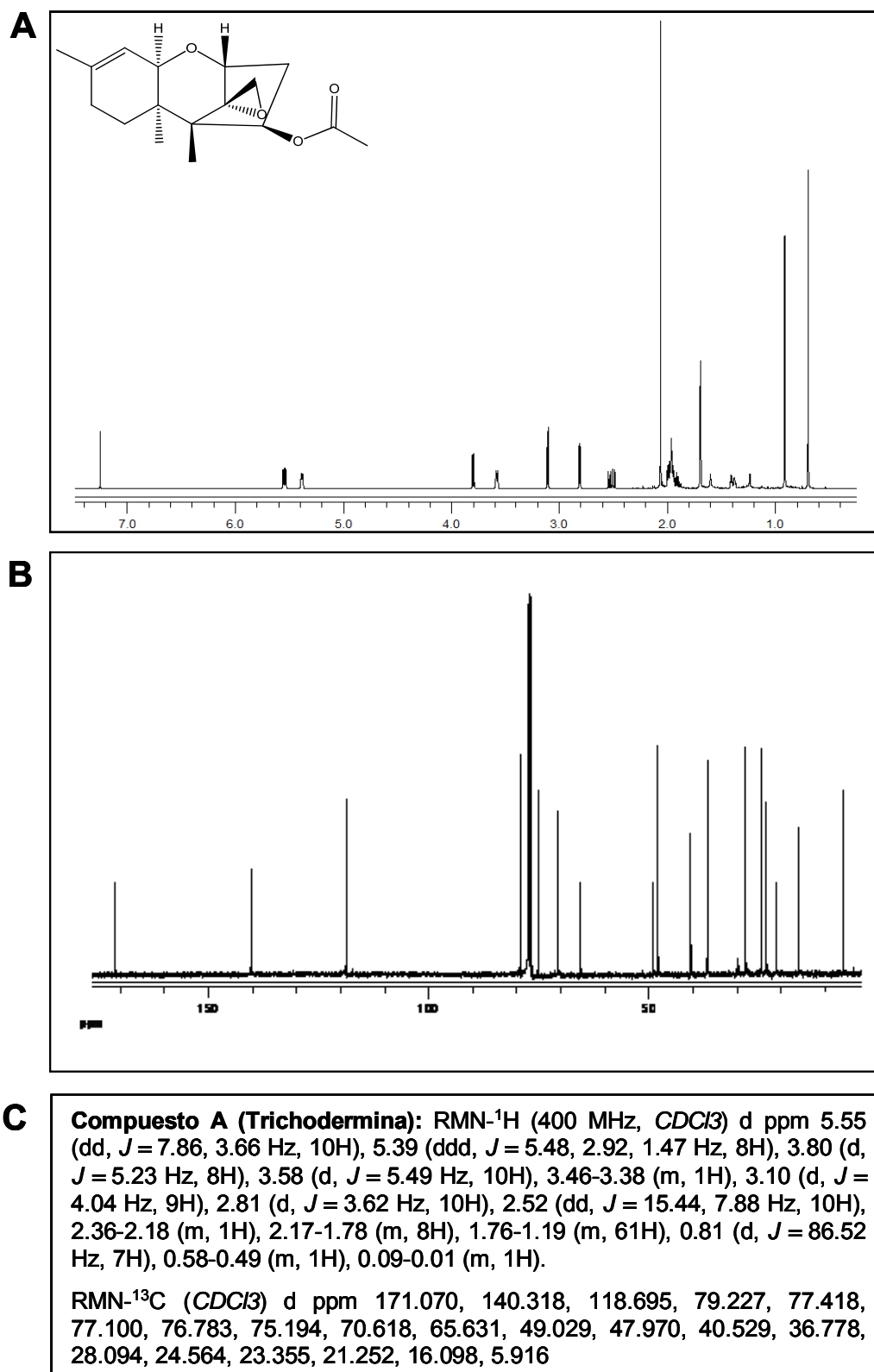


Figura 32. Espectros de RMN del compuesto A (trichodermina) 4β-acetoxy-12,13 epoxitrichoteco-9-eno. Espectro de RMN-¹H (A). Espectro de RMN-¹³C (B). Interpretación de los picos obtenidos (C).

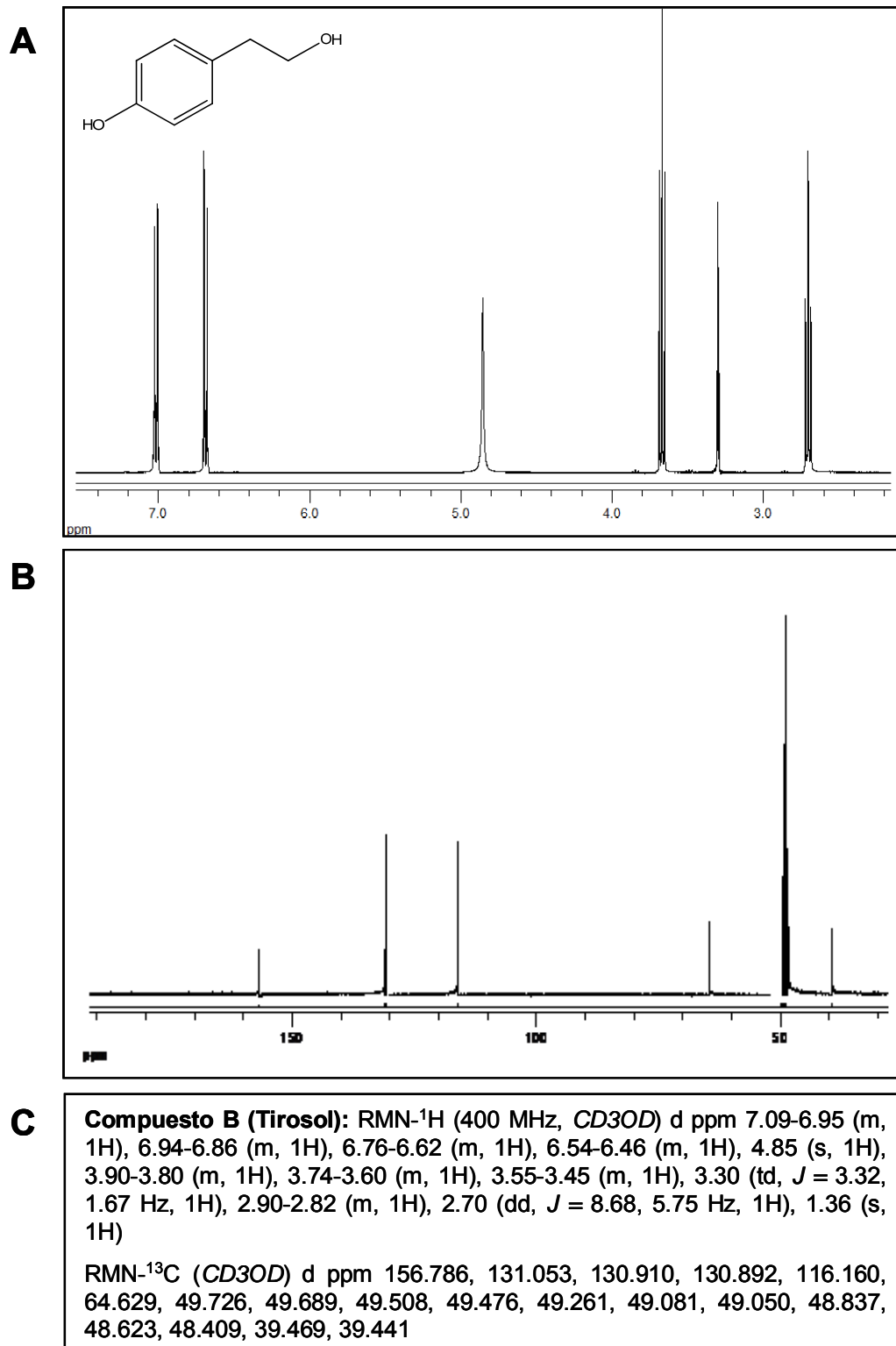


Figura 33. Espectros de RMN del compuesto B (Tirosol) 4-(2-hidroxietil) fenol. Espectro de RMN- ^1H (A). Espectro de RMN- ^{13}C (B). Interpretación de los picos obtenidos (C).

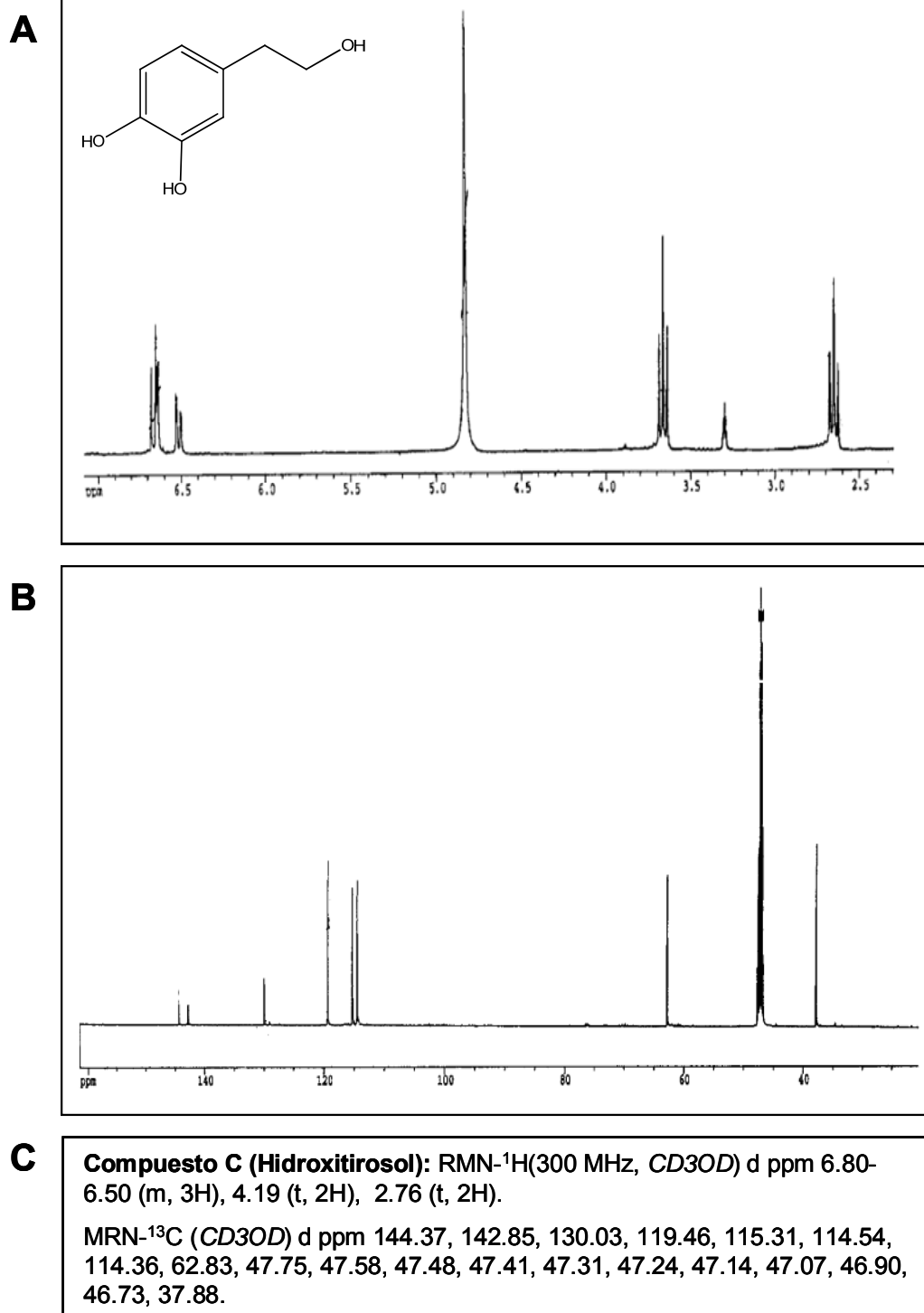


Figura 34. Espectros de RMN del compuesto C (Hidroxitiroso) 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol. Espectro de RMN- ^1H (A). Espectro de RMN- ^{13}C (B). Interpretación de los picos obtenidos (C).

3.2.5. Ensayos de actividad antimicrobiana

Con objeto de investigar si la sobreexpresión del gen *Tbtri5* en la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 afectaba a su actividad antimicrobiana, la cepa silvestre y los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5 se incluyeron en diferentes ensayos para comparar su actividad.

3.2.5.1. Ensayos con extractos acetónicos en medio sólido

En este ensayo, que se describe en el apartado 12.2.2 de Materiales y Métodos, se utilizaron extractos acetónicos que se habían obtenido a partir de sobrenadantes de cultivo de las cepas *T. brevicompactum* IBT 40841, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, crecidas en dos medios de cultivo diferentes, PDB y CYS80. Se evaluó la actividad antimicrobiana de las mismas frente a dos levaduras procedentes de la CECT y frente a un panel de microorganismos de la colección de MSD, que incluye patógenos clínicos y cepas control de laboratorio. La actividad antimicrobiana detectada, en medio sólido, con los diferentes extractos acetónicos de las distintas cepas de *T. brevicompactum*, frente a bacterias y frente a hongos se muestra en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

Todos los extractos acetónicos ensayados mostraron capacidad para inhibir, al menos, a dos de los microorganismos incluidos en el panel.

De forma general, los extractos acetónicos obtenidos a partir de cultivos en medio PDB mostraron mayor actividad que aquellos procedentes de medio CYS80. También de forma general, los extractos procedentes de los tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5* mostraron similar o mayor actividad antimicrobiana que aquellos de la cepa silvestre. La mayor actividad antimicrobiana se observó en extractos procedentes del transformante Tb41tri5 crecido en medio PDB. Cuando se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de cepas sensibles a los extractos acetónicos provenientes de medio PDB respecto a los de CYS80.

Considerando la actividad antibacteriana de los extractos, éstos fueron más activos frente a las bacterias Gram positivas (Tabla 10). Todos los extractos acetónicos procedentes de cultivos en PDB de las diferentes cepas de *Trichoderma* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* MB 5393, *E. faecium* MB 5571 y *B. subtilis* MB 964 (bacterias Gram positivas), pero no el crecimiento de *P. aeruginosa* MB 979 y *E. coli* BM 4926 (bacterias Gram negativas).

Las diferencias de actividad entre los extractos procedentes de los medios de cultivo PDB y CYS80 fueron estadísticamente significativas para las tres bacterias Gram positivas

incluidas en el panel ($p < 0,001$). A su vez, para los extractos procedentes de los cultivos de PDB, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los de la cepa silvestre, IBT 40841, y los de los tres transformantes, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, frente a *S. aureus* MB5393 ($p \leq 0,01$) y *B. subtilis* MB 5571 ($p \leq 0,04$); y, entre los de la cepa silvestre y los de los transformantes Tb40tri5 y Tb41tri5 frente a *E. faecium* MB 5571 ($p < 0,05$).

Para los extractos procedentes de cultivos de las distintas cepas de *Trichoderma* en medio CYS80, observamos diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,01$) entre los de la cepa silvestre IBT 40841 y los de los tres transformantes frente a *S. aureus* MB 5393, *E. faecium* MB 5571 y *B. subtilis* MB 964.

Tabla 10. Actividad antibacteriana, expresada en mm, detectada en extractos acetónicos de *T. brevicompactum* IBT 40841 y de tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, obtenidos a partir de cultivos en los medios PDB y CYS80.

Tratamiento	Medio PDB				
	<i>B. subtilis</i> MB 964	<i>E. faecium</i> MB 5571	<i>S. aureus</i> MB 5349	<i>E. coli</i> MB 4926	<i>P. aeruginosa</i> MB 979
IBT 40841	6,8 ($\pm 0,5$)	7,5 ($\pm 1,3$)	9 (± 0)	N	N
Tb38tri5	7,8 ($\pm 0,5$)	8,8 ($\pm 0,5$)	10,5 ($\pm 0,6$)	N	N
Tb40tri5	8 (± 0)	9,8 ($\pm 0,5$)	11,5 ($\pm 0,6$)	N	N
Tb41tri5	11 (± 0)	12 (± 0)	13 (± 0)	N	N
Antibiótico control	8 ($\pm 0,5$)	25 ($\pm 0,7$)	14 ($\pm 0,5$) 17 ($\pm 0,5$)	17 ($\pm 0,4$)	7 ($\pm 0,5$)

Tratamiento	Medio CYS80				
	<i>B. subtilis</i> MB 964	<i>E. faecium</i> MB 5571	<i>S. aureus</i> MB 5349	<i>E. coli</i> MB 4926	<i>P. aeruginosa</i> MB 979
IBT 40841	N	N	N	N	N
Tb38tri5	6 (± 0)	7,5 ($\pm 0,7$)	9 (± 0)	N	N
Tb40tri5	6 (± 0)	8,3 ($\pm 1,1$)	7,6 ($\pm 0,5$)	N	N
Tb41tri5	5 (± 0)	7 (± 0)	7 (± 0)	N	N
Antibiótico control	8 ($\pm 0,5$)	25 ($\pm 0,7$)	14 ($\pm 0,5$) 17 ($\pm 0,5$)	17 ($\pm 0,4$)	7 ($\pm 0,5$)

Los datos se obtuvieron en ensayos de difusión en medio sólido y corresponden al diámetro de la zona de inhibición del crecimiento de cinco bacterias usadas como diana con sus respectivas desviaciones estándar. N: no inhibición. Antibióticos control: *B. subtilis* (higromicina 300 $\mu\text{g/mL}$); *E. faecium* (penicilina 32 $\mu\text{g/mL}$); *S. aureus* (kanamicina 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y claritromicina 0,65 $\mu\text{g/mL}$); *E. coli* (gentamicina 50 $\mu\text{g/mL}$); *P. aeruginosa* (gentamicina 50 $\mu\text{g/mL}$).

Considerando la actividad frente a las tres levaduras del panel de MSD, dos levaduras de la CECT y frente a un hongo filamentoso de MSD (Tabla 11), los extractos acetónicos más activos fueron aquellos que procedían de las incubaciones de las distintas cepas de *Trichoderma* en el medio PDB. Las diferencias entre PDB y CYS80 fueron, estadísticamente significativas, frente a *S. cerevisiae* CECT 1383 ($p = 0,005$), *K. marxianus* CECT 1018 ($p < 0,001$), *C. albicans* MY 1055 ($p < 0,001$), *C. glabrata* MY 992 ($p < 0,001$), *C. tropicalis* MY 1012 ($p < 0,001$) y *A. fumigatus* MF 5668 ($p < 0,001$). A su vez, para el medio PDB se observaron diferencias, estadísticamente significativas, entre los extractos procedentes de la cepa silvestre, IBT 40841,

y los extractos de los tres transformantes frente a *S. cerevisiae* CECT 1383 ($p=0,04$), *C. albicans* MY 1055 ($p=0,01$) y *C. tropicalis* MY 1012 ($p=0,03$); y, entre los extractos de la cepa silvestre y los del transformante Tb41tri5, frente a *K. marxianus* CECT 1018 ($p=0,042$), *C. glabrata* MY 992 ($p=0,018$) y *A. fumigatus* MF 5668 ($p=0,029$).

Además se observaron diferencias significativas entre los extractos procedentes de cultivos de *Trichoderma* en CYS80 de la cepa IBT 40841 y de los tres transformantes, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, frente a *S. cerevisiae* CECT 1383 ($p\leq 0,03$), *K. marxianus* CECT 1018 ($p=0,043$), *C. albicans* MY 1055 ($p\leq 0,013$), *C. glabrata* MY 992 ($p\leq 0,01$) y *A. fumigatus* MF 5668 ($p\leq 0,01$). También se observaron diferencias significativas entre los extractos de IBT 40841 y Tb40tri5 frente a *C. tropicalis* MY 1012 ($p=0,018$).

Tabla 11. Actividad antilevadura y antifúngica, expresadas en mm, detectadas en extractos acetónicos de *T. brevicompactum* IBT 40841 y de tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, obtenidos a partir de cultivos en los medios PDB y CYS80.

Tratamiento	Medio PDB					
	<i>S. cerevisiae</i> CECT 1383	<i>K. marxianus</i> CECT 1018	<i>C. albicans</i> MY 1055	<i>C. glabrata</i> MY 992	<i>C. tropicalis</i> MY 1012	<i>A. fumigatus</i> MF 5668
IBT 40841	6,5 (± 1)	16,5 (± 1)	15,8 ($\pm 0,5$)	17,7 ($\pm 0,6$)	16,3 ($\pm 0,5$)	14,8 ($\pm 0,8$)
Tb38tri5	17,5 ($\pm 0,5$)	16,5 (± 1)	18,8 ($\pm 0,5$)	18,7 ($\pm 0,5$)	17,8 ($\pm 0,5$)	14 ($\pm 0,5$)
Tb40tri5	14,5 ($\pm 0,5$)	17,5 ($\pm 0,5$)	17,8 ($\pm 0,5$)	18,5 (± 1)	17,5 ($\pm 0,6$)	14,8 ($\pm 0,6$)
Tb41tri5	20,5 ($\pm 0,5$)	22,5 (± 1)	19,5 ($\pm 0,7$)	23 ($\pm 1,4$)	20 (± 0)	20 (± 0)
Anfotericina B	15 ($\pm 0,5$)	12 (± 1)	18 ($\pm 0,6$)	15 ($\pm 0,5$)	-	18 ($\pm 0,5$)
Higromicina	0 ($\pm 0,5$)	21 (± 1)	-	-	8 ($\pm 0,4$)	-

Tratamiento	Medio CYS80					
	<i>S. cerevisiae</i> CECT 1383	<i>K. marxianus</i> CECT 1018	<i>C. albicans</i> MY 1055	<i>C. glabrata</i> MY 992	<i>C. tropicalis</i> MY 1012	<i>A. fumigatus</i> MF 5668
IBT 40841	N	6,5 (± 1)	8,5 (± 0)	N	9 ($\pm 1,1$)	N
Tb38tri5	11,5 (± 1)	14,5 (± 1)	12,5 (± 1)	14 (± 0)	10,5 ($\pm 3,2$)	12,5 (± 1)
Tb40tri5	11 (± 1)	13,5 ($\pm 0,5$)	13,8 ($\pm 0,9$)	15 ($\pm 0,5$)	15,5 ($\pm 3,1$)	11,3 ($\pm 0,95$)
Tb41tri5	7 ($\pm 0,5$)	9,5 (± 1)	13 (± 0)	14 (± 0)	9 (± 0)	12 (± 0)
Anfotericina B	15 ($\pm 0,5$)	12 (± 1)	18 ($\pm 0,6$)	15 ($\pm 0,5$)	-	18 ($\pm 0,5$)
Higromicina	0 ($\pm 0,5$)	21 (± 1)	-	-	8 ($\pm 0,4$)	-

Los datos se obtuvieron a partir de ensayos de difusión en medio sólido, corresponden al diámetro de la zona de inhibición del crecimiento de tres levaduras y un hongo filamentoso, usados como diana, con sus respectivas desviaciones estándar. N: no inhibición. -: sin datos. Antibióticos control: *S. cerevisiae* (anfotericina B 0,25 $\mu\text{g/mL}$, higromicina 300 $\mu\text{g/mL}$), *K. marxianus* (anfotericina B 0,25 $\mu\text{g/mL}$, higromicina 300 $\mu\text{g/mL}$); *C. albicans* (anfotericina B 0,25 $\mu\text{g/mL}$); *C. glabrata* (anfotericina B 0,25 $\mu\text{g/mL}$); *C. tropicalis* (higromicina 300 $\mu\text{g/mL}$); *A. fumigatus* (anfotericina B 0,25 $\mu\text{g/mL}$).

3.2.5.2. Ensayos con extractos acetónicos en medio líquido

En este ensayo, que se describe en el apartado 12.2.3 de Materiales y Métodos, se utilizaron extractos acetónicos que se habían obtenido a partir de sobrenadantes de cultivo de *T. brevicompactum* IBT 40841, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, crecidos en dos medios de cultivo diferentes, PDB y CYS80, con objeto de analizar la actividad antimicrobiana en medio líquido frente a *A. baumannii* MB 5973, un patógeno con interés clínico por su capacidad para desarrollar resistencias y para el que no se tenía estandarizado el ensayo en medio sólido. En este estudio se incluyeron como controles una bacteria Gram positiva, *S. aureus* MB 167, y dos Gram negativas, *P. aeruginosa* MB 5919 y *E. coli* MB 5846.

Los valores de actividad antimicrobiana obtenidos en los ensayos realizados en medio líquido se muestran en la Tabla 12. La mayor actividad frente a *A. baumannii* MB 5973 se observó con extractos procedentes del transformante Tb41tri5 incubado en medio PDB. Sin embargo, ninguno de los extractos procedentes de medio CYS80 de las cuatro cepas ensayadas mostraron actividad frente a *A. baumannii* MB 5973. Tampoco estos últimos extractos mostraron actividad frente a *P. aeruginosa* MB 5919. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los extractos provenientes de cultivos en CYS80 de la cepa silvestre IBT 40841 y los tres transformantes, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, frente a *S. aureus* MB 167 ($p \leq 0,01$).

Para las cuatro cepas de *T. brevicompactum* analizadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los extractos procedentes de cultivos de los medios PDB y CYS80 frente a *A. baumannii* MB 5973 ($p \leq 0,013$). También hubo diferencias estadísticamente significativas entre extractos procedentes de CYS80 de la cepa silvestre y los transformantes, Tb40tri5 y Tb41tri5 frente a *E. coli* MB 5746 ($p = 0,019$). A su vez, se detectaron diferencias significativas entre extractos procedentes, de medio PDB, de la cepa silvestre y de los tres transformantes frente a *A. baumannii* MB 5973 ($p < 0,001$) y *E. coli* MB 5746 ($p = 0,02$).

3.2.5.3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos acetónicos

La CMI de los extractos acetónicos obtenidos a partir de *T. brevicompactum* IBT 40841 y de los tres transformantes se calculó según el ensayo descrito en el apartado 12.2.4 de Materiales y Métodos. Frente a todos los patógenos incluidos en el ensayo, los valores de la CMI fueron mayores para los extractos procedentes de la cepa silvestre que para los de los transformantes. Y se determinó una CMI dos veces menor en los extractos de los transformantes con respecto a la cepa silvestre frente a *S. aureus* MB 167 y a *C. albicans* MY 1055. En el caso de *A. baumannii* MB 5973, aunque no se llegó a un 99% de inhibición con las concentraciones probadas de los extractos acetónicos, se observó que la mayor concentración utilizada de extracto del transformante Tb41tri5 inhibía en un 75% su crecimiento, en comparación con el extracto de la cepa silvestre que no mostró ningún efecto inhibitorio frente

a esta bacteria. De igual forma, la mayor concentración utilizada de extracto del transformante Tb41tri5 inhibía en un 73,3% el crecimiento de *E. coli* MB 5746, mientras que el extracto de la cepa silvestre sólo inhibía a esta bacteria un 48,5%.

Tabla 12. Actividad antibacteriana, expresada en porcentaje de inhibición del crecimiento, detectada en extractos acetónicos de *T. brevicompactum* IBT 40841 y de los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, obtenidos a partir de cultivos en los medios PDB y CYS80.

Tratamiento	Medio PDB			
	<i>A. baumannii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	MB 5973	MB 167	MB 5746	MB 5919
IBT 40841	N	98,7 ($\pm 0,6$)	46,3 ($\pm 3,8$)	N
Tb38tri5	30,3 ($\pm 3,2$)	98,5 ($\pm 0,6$)	57,9 ($\pm 2,3$)	N
Tb40tri5	33,8 ($\pm 1,3$)	98,9 ($\pm 0,5$)	60,8 ($\pm 3,1$)	N
Tb41tri5	61,6 ($\pm 1,6$)	98,9 ($\pm 0,6$)	72,0 ($\pm 1,6$)	N
Antibiótico control	99,9 ($\pm 0,1$)	99,1 ($\pm 0,2$)	99,5 ($\pm 0,3$)	99,4 ($\pm 0,2$)
Tratamiento	Medio CYS80			
	<i>A. baumannii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	MB 5973	MB 167	MB 5746	MB 5919
IBT 40841	N	26,9 ($\pm 3,1$)	50,6 ($\pm 3,2$)	N
Tb38tri5	N	98,9 ($\pm 0,9$)	50,6 ($\pm 3,5$)	N
Tb40tri5	N	99,4 ($\pm 1,9$)	57,4 ($\pm 1,01$)	N
Tb41tri5	N	60,5 ($\pm 2,5$)	57,3 ($\pm 3,2$)	N
Antibiótico control	99,9 ($\pm 0,1$)	99,1 ($\pm 0,2$)	99,5 ($\pm 0,3$)	99,4 ($\pm 0,2$)

Los datos se obtuvieron a partir de ensayos realizados en medio líquido e indican el porcentaje de inhibición del crecimiento de cuatro bacterias diana con sus desviaciones estándar. N: no inhibición. Antibióticos control: *A. baumannii* (ciprofloxacino 0,125 $\mu\text{g/mL}$); *S. aureus* (penicilina G 0,312 $\mu\text{g/mL}$); *E. coli* (novobiocina 25 $\mu\text{g/mL}$); *P. aeruginosa* (ciprofloxacino 0,125 $\mu\text{g/mL}$).

3.2.5.4. Ensayos con metabolitos secundarios

Se evaluó la actividad antimicrobiana frente a un panel de diez microorganismos diana de los tres compuestos: trichodermina, tirosol e hidroxitirosol; que inicialmente se detectaron en cantidades diferenciales en el sobrenadante del transformante Tb41tri5 y que se purificaron mediante técnicas cromatográficas y HPLC. La actividad frente a tres *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*), *S. cerevisiae* CECT 1383, *K. marxianus* CECT 1018, un hongo filamentoso (*A. fumigatus*), una bacteria Gram positiva (*S. aureus*) y tres bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *E. faecalis*), se evaluó por el método de Kirby Bauer con ligeras modificaciones (apartado 12.3 de Materiales y Métodos), y se utilizaron seis concentraciones diferentes de trichodermina, tirosol e hidroxitirosol.

Los resultados de inhibición del crecimiento de los patógenos provocados por la trichodermina, y las concentraciones a la que se ensayó se recogen en las Tablas 13 y 14. No se detectó ninguna actividad frente a los diez microorganismos diana con tirosol ni con hidroxitirosol a las seis concentraciones a las que fueron ensayados (desde 360 hasta 6 μg).

La trichodermina, que se ensayó a seis concentraciones diferentes, entre 6 y 360 µg, mostró una actividad dependiente de la dosis. La mayor actividad se observó frente a las tres especies de *Candida*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y el hongo filamentoso *A. fumigatus*, observándose en general inhibición hasta la concentración de 6 µg (Tabla 13). Para las bacterias, la mayor actividad la mostró frente a *P. aeruginosa*, observándose inhibición hasta la concentración de 90 µg. Frente a *S. aureus* y *A. baumannii*, se observó inhibición desde 360 y hasta 90 µg de metabolito y frente a *E. faecalis* sólo para la concentración de 360 µg (Tabla 14).

Tabla 13. Actividades antilevadura y antifúngica, expresadas en mm, de la trichodermina purificada a partir de sobrenadante de cultivo del transformante *T. brevicompactum* Tb41tri5.

Tratamiento	Concentración µg	<i>S. cerevisiae</i> CECT 1383	<i>K. marxianus</i> CECT 1018	<i>C. albicans</i> MY 1055	<i>C. glabrata</i> MY 992	<i>C. tropicalis</i> MY 1012	<i>A. fumigatus</i> MF 5568
Trichodermina	360	42,5 (±1)	43 (±0,5)	53,7 (±0,5)	38 (±1)	58,3 (±0,5)	29 (±1)
	240	42 (±0,5)	40,5 (±0,7)	52 (±1)	30,7 (±0,5)	55,3 (±0,5)	26,7 (±0,6)
	90	36,3 (±1,2)	32,7 (±0,6)	45,7 (±0,6)	29,3 (±0,5)	53 (±1)	24,6 (±0,5)
	60	35,5 (±0,6)	30,7 (±0,5)	42,7 (±0,5)	26 (±0)	51,7 (±0,5)	22,7 (±0,4)
	9	23 (±0,5)	20,3 (±0,6)	34,3 (±0,5)	7,3 (±0,6)	40,7 (±1)	14,7 (±0,5)
	6	21 (±1)	17,7 (±0,6)	31 (±0,5)	N	36,7 (±0,5)	13 (±1)
Anfotericina B	360	22,4 (±1)	20,5 (±1)	22,7 (±0,6)	40 (±1)	N	13,3 (±0,5)
	240	18,3 (±0,6)	16,2 (±0,5)	20,3 (±0,5)	22,3 (±0,5)	N	12,7 (±0,5)
	90	17,5 (±0,5)	13,7 (±0,7)	19,6 (±0,6)	21,7 (±0,5)	N	11,7 (±0,6)
	60	16 (±0,5)	12,5 (±1)	19 (±0,5)	20,7 (±0,5)	N	11,6 (±0,5)
Higromicina	360	25 (±1)	28,2 (±0,4)	29 (±1)	44,7 (±0,5)	18,7 (±0,5)	27,3 (±0,3)
	240	21,4 (±0,6)	26,5 (±0,5)	23,3 (±0,6)	40,3 (±0,5)	16,3 (±0,5)	24,7 (±0,5)
	90	N	20,6 (±0,3)	19,3 (±0,5)	35,3 (±0,5)	N	19,7 (±0,4)
	60	N	15,2 (±1)	15,7 (±0,5)	33,7 (±0,5)	N	16,6 (±0,5)

Los datos se obtuvieron a partir de ensayos de difusión en medio sólido y corresponden al diámetro de la zona de inhibición del crecimiento de cinco levaduras y un hongo filamentoso, usados como diana, con sus respectivas desviaciones estándar. N: no inhibición. -: sin datos. Antibióticos control: anfotericina B 360-60 µg, higromicina 360-60 µg.

En la Figura 35 se muestra el crecimiento de diferentes microorganismos patógenos humanos en presencia de distintas concentraciones de trichodermina (ver pie de la Figura 35).

Tabla 14. Actividad antibacteriana expresada en mm, de la trichodermína purificada a partir de sobrenadante de cultivo del transformante *T. brevicompactum* Tb41tri5.

Tratamiento	Concentración μg	<i>A. baumannii</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Trichodermina	360	17 ($\pm 0,5$)	16 ($\pm 0,5$)	21 ($\pm 0,5$)	23 ($\pm 0,7$)
	240	14 ($\pm 0,5$)	N	17 ($\pm 0,5$)	18 ($\pm 0,5$)
	90	8,9 ($\pm 1,0$)	N	12,5 ($\pm 1,0$)	17,5 ($\pm 1,0$)
	60	N	N	N	N
	9	N	N	N	N
	6	N	N	N	N
Amikacina	360	18 ($\pm 1,0$)	N	-	21 ($\pm 1,0$)
	90	N	N	-	5 ($\pm 0,3$)
Ampicilina	360	-	N	-	-
	90	-	N	-	-
Cefotaxime	360	-	-	24 ($\pm 0,5$)	-
	90	-	-	19 ($\pm 0,2$)	-
Cloranfenicol	360	-	23 ($\pm 0,3$)	-	-
	90	-	N	-	-
Rifampicina	6	-	-	30 ($\pm 0,5$)	-

Los datos corresponden al diámetro de la zona de inhibición del crecimiento de cuatro bacterias nosocomiales, usadas como diana con sus desviaciones estándar. N: no inhibición. El metabolito se utilizó a seis concentraciones diferentes (desde 360 hasta 6 μg). Antibióticos control: *A. baumannii* (amikacina 360 y 90 μg); *E. faecalis* (amikacina 360 y 90 μg , ampicilina 360 y 90 μg , cloranfenicol 360 y 90 μg); *S. aureus* (cefotaxime 360 y 90 μg , rifampicina 6 μg); *P. aeruginosa* (amikacina 360 y 90 μg).

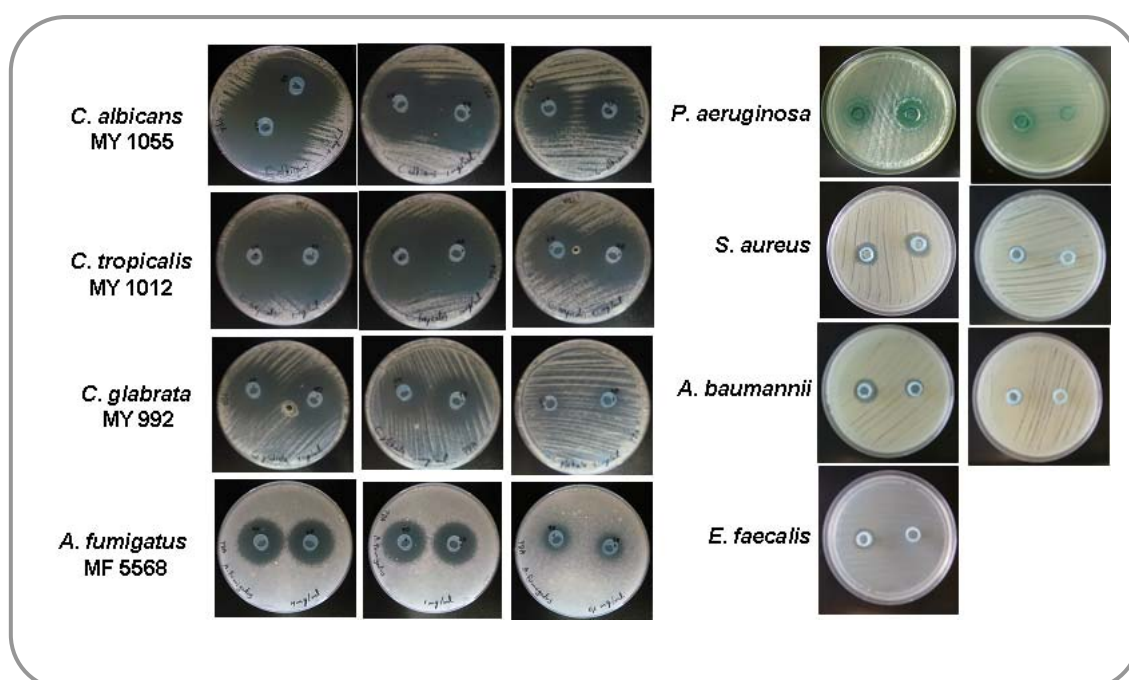


Figura 35. Halos de inhibición de ocho microorganismos patógenos humanos en presencia de trichodermína.

La trichodermína, en general mostró actividad frente a las tres especies de *Candida* y *A. fumigatus* a 360 y 240, 90 y 60, 9 y 6 μg (de izquierda a derecha), frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *A. baumannii* a 360 y 240, 90 y 60 μg , y frente a *E. faecalis* a 360 y 240 μg .

3.2.6. Ensayos de actividad antitumoral y citotóxica

Con objeto de analizar si la sobreexpresión del gen *Tbtri5* en *T. brevicompactum* IBT 40841 afectaba a la actividad antitumoral y citotóxica de la cepa, se realizaron diferentes ensayos en los que se incluyeron distintas líneas de células sanas y células tumorales de la colección de la ATCC y Tebu-bio® (recogidas en el apartado 1.4 de Materiales y Métodos).

3.2.6.1. Actividad antitumoral de extractos acetónicos

Se evaluó la capacidad antitumoral de diluciones seriadas de los extractos acetónicos obtenidos a partir de cultivos, en PDB y en CYS80, de la cepa silvestre y de los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, en seis líneas celulares tumorales y dos líneas celulares sanas (apartado 13.2 de Materiales y Métodos).

En la Tabla 15 se muestra la actividad antitumoral, expresada como DE50, de dichos extractos acetónicos. Se observó que todos los extractos mostraron, al menos, una actividad antitumoral frente a dos de las líneas celulares ensayadas. En general, se vió un incremento de la actividad de los extractos provenientes de cultivos de *Trichoderma* en medio PDB respecto a los de CYS80, y las diferencias fueron estadísticamente significativas para todas las líneas celulares utilizadas [A-549 ($p=0,002$), Hep-G2 ($p=0,003$), HT-29 ($p=0,035$), MCF-7 ($p<0,001$), Mes-SA ($p=0,002$), Mes-SA/Dx5 ($p=0,004$) y 184-A1 ($p=0,001$)], excepto para la CCD-16Lu ($p=0,079$). Además, los extractos procedentes de los tres transformantes mostraron una actividad antitumoral similar o mayor que los de la cepa silvestre.

Las líneas celulares de colon (HT-29), pulmón (A-549) y carcinoma de hígado humano (Hep-G2) mostraron la mayor resistencia a los extractos acetónicos, procedentes tanto de cultivos en PDB como en CYS80, mientras que las líneas celulares tumorales de mama (MCF-7), ovario no resistente a doxorubicina (MES-SA) y ovario resistente a doxorubicina (MES-SA/Dx5) fueron las más sensibles a los extractos acetónicos de *Trichoderma*.

El extracto procedente de cultivos en PDB del transformante Tb41tri5 mostró la mayor actividad antitumoral frente a todas las líneas celulares utilizadas [A-549 ($p=0,020$), Hep-G2 ($p=0,020$), HT-29 ($p=0,020$), MCF-7 ($p=0,039$), MES-SA ($p=0,034$), MES-SA/Dx5 ($p=0,050$)]. Se observaron diferencias, estadísticamente significativas, entre la actividad de los extractos procedentes de cultivos, en medio PDB, del transformante Tb41tri5 y de la cepa silvestre frente a las líneas celulares Hep-G2 ($p=0,006$) y MES-SA/Dx5 ($p=0,034$). También se observaron diferencias significativas, en PDB, entre los extractos de Tb40tri5 y los de la cepa silvestre frente a las líneas celulares Hep-G2 ($p=0,004$), HT-29 ($p=0,006$) y MES-SA ($p=0,014$).

Tabla 15. Actividad antitumoral, expresada como DE50, de extractos acetónicos procedentes de cultivos de *T. brevicompactum* IBT 40841 y de tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*: Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5; en PDB y CYS80, frente a 6 líneas celulares tumorales y dos líneas celulares sanas.

Extractos	DE50 ± DE (%Inh 2x)							
	A-549	Hep-G2	HT-29	MCF-7	MES-SA	MES-SA/Dx5	184-A1	CCD-16Lu
IBT40841-PDB	>2 (41,41%)	>2 (42,22%)	>2 (37,46%)	1,19±0,18	1,92±0,04	1,34±0,05	0,2±0,09	>2 (39,61%)
Tb38tri5-PDB	>2 (27,94%)	>2 (52,85%)	>2 (33,88%)	1,45±0,48	>2 (47,06%)	1,22±0,07	0,41±0,09	0,32±0,03
Tb40tri5-PDB	>2 (34,92%)	1,02±0,24	1,57±0,18	1,16±0,14	1,35±0,23	1,34±0,23	0,209±0,09	0,37±0,07
Tb41tri5-PDB	1,16±0,25	0,34±0,09	0,42±0,03	0,36±0,10	0,46±0,16	0,44±0,12	0,34±0,09	>2(0%)
IBT40841-CYS80	>2 (26,37%)	>2 (26,9%)	>2 (21,74%)	>2 (29,31%)	>2 (29,7%)	>2 (33,99%)	0,085±0,015	>2 (27,76%)
Tb38tri5-CYS80	>2 (27,52%)	>2 (38,26%)	>2 (37,67%)	>2 (35,85%)	1,83±0,11	1,28±0,05	0,26±0,09	0,34±0,015
Tb40tri5-CYS80	>2 (29,62%)	1,12±0,05	>2 (39,64%)	0,77±0,32	>2 (44,98%)	1,77±0,12	0,05±0,009	0,25±0,02
Tb41tri5-CYS80	>2 (19,67%)	>2 (39,92%)	>2 (20,24%)	>2 (26,82%)	>2(0%)	>2 (27,15%)	0,27±0,03	>2 (0%)
Actinomicina D ^a	204,83±15,25	91,03±10,24	183,48±19,63	4,3±0,92	82,41±10,93	19±2,16	157,99±23,06	115,14±21,19
Doxorubicina ^a	128,48±12,5	85,61±8,15	213,6±26,93	21,9±3,18	154,96±15,32	>500	85,025±12,15	398,69±41,32
Rotenona ^a	28,8±3,6	26,2±4,16	187,004±15,91	78,81±12,10	442,88±31,47	206±19,63	215,25±21,48	132,24±23,26
MMS ^a	325,89±16,9	480,65±21,3	640,21±18,34	321,16±32,12	421,8±20,96	989,54±41,12	558,7±26,75	421,87±27,85

Los resultados de actividad, expresados como DE50, se obtuvieron mediante el ensayo de MTT. Entre paréntesis se indica el porcentaje de inhibición de los extractos acetónicos, a la mayor concentración ensayada. Líneas celulares: A-549, adenocarcinoma de pulmón; Hep-G2, carcinoma hepatocelular; HT-29, adenocarcinoma colorrectal humano; MCF-7, adenocarcinoma de mama; MES-SA, sarcoma uterino humano; MES-SA/Dx5, sarcoma uterino humano resistente a doxorubicina; 184A1, glándula mamaria normal; y CCD-16Lu, fibroblastos de pulmón normal. El metil metano sulfonato y los antibióticos rotenona, doxorubicina y actinomicina D fueron incluidos como controles.

Las líneas tumorales MES-SA ($p=0,020$) y MES-SA/Dx5 ($p=0,020$) mostraron mayor sensibilidad a los extractos acetónicos procedentes del transformante Tb38tri5 incubado en CYS80 que a los de la cepa silvestre incubada en ese medio, siendo estadísticamente significativas las diferencias para las líneas celulares Hep-G2 ($p=0,010$) y HT-29 ($p=0,006$). A su vez, se observó que los extractos de Tb40tri5, incubado en CYS80, mostraron un incremento en la actividad antitumoral, diferencias estadísticamente significativas respecto a los de la cepa silvestre, frente a las líneas Hep-G2 ($p=0,004$), HT-29 ($p=0,016$), MCF-7 ($p=0,004$), MES-SA ($p=0,004$) y MES-SA/Dx5 ($p=0,004$). Sin embargo, los extractos procedentes de cultivos en CYS80 del transformante Tb41tri5 sólo mostraron mayor actividad respecto a los de la cepa silvestre cuando la línea Hep-G2 ($p=0,02$) fue utilizada.

3.2.6.2. Citotoxicidad de los extractos acetónicos

Se determinó la citotoxicidad de los extractos acetónicos, provenientes de cultivos en PDB y CYS80, de la cepa IBT 40841 y de los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, en líneas celulares sanas de mama (184-A1) y pulmón (CCD-16Lu), preparadas según se describe en el apartado 13.1 de Materiales y Métodos, y utilizando el método MTT (apartado 13.2 de Materiales y Métodos).

En general, las líneas celulares sanas mostraron mayor sensibilidad que las tumorales a los diferentes extractos acetónicos de *Trichoderma*. Sin embargo, el extracto acetónico procedente del transformante Tb41tri5, incubado en PDB, que mostró la mayor actividad antitumoral frente a la línea de carcinoma de pulmón (A-549), no mostró actividad citotóxica frente a la línea sana de pulmón (CCD-16Lu) ($p=0,037$). También, este extracto, mostró mayor actividad citotóxica, con diferencias estadísticamente significativas respecto a los de la cepa silvestre, frente a la línea celular de mama sana 184-A1 ($p=0,020$) (Tabla 15).

Con objeto de analizar si los cambios morfológicos que producían los extractos acetónicos de *Trichoderma* en las líneas celulares eran reversibles, se realizó un ensayo en el que se incluyeron las siguientes líneas: 184-A1 (mama sana), CCD-16Lu (pulmón sano), MC7-7 (mama tumoral) y A-549 (carcinoma de pulmón). El ensayo (apartado 13.5 de Materiales y Métodos) se realizó con los extractos obtenidos a partir de la cepa IBT 40841 incubada en medio PDB.

Ya que el DMSO se había utilizado como solvente en la preparación de los extractos acetónicos, como control se incluyeron líneas celulares tratadas con este solvente. También se incluyeron, como control positivo, líneas celulares tratadas con el agente alquilante MMS.

Por microscopía óptica observamos el mismo patrón de reversión morfológica celular para ambas líneas celulares (184-A1 y CCD-16Lu), además de un mismo patrón de no reversión morfológica celular para las líneas celulares tumorales MC7-7 (mama tumoral) y A-549 (carcinoma de pulmón).

La Figura 36 muestra un ejemplo de la reversión morfológica celular observada para la línea celular 184-A1. Para esta línea, se observó daño celular a las 24 h de contacto con el extracto acetónico de la cepa IBT 40841 proveniente de cultivo en PDB (A, en la Figura 36), 24 h después de agregar el medio de cultivo fresco a la línea 184-A1 tratada con el extracto, la morfología celular empieza a revertir (B) y 48 h después de que la línea 184-A1 estuviera en contacto con medio de cultivo fresco, la morfología celular se observa completamente normal (C). También observamos efecto citotóxico a las 24 h de tratamiento de la línea 184-A1 con el MMS (D), 24 h después de agregar medio de cultivo fresco a la línea 184-A1 tratada con MMS, el efecto citotóxico observado tras añadir este agente alquilante no es reversible (E). Por otro lado, el efecto observado a las 24 h de tratamiento de la línea 184-A1 con DMSO (F), y hasta 48 h con DMSO, muestra alrededor de 1% de citotoxicidad (G). Finalmente, observamos que la línea celular tumoral MCF-7 tratada con el extracto acetónico, durante 12 h, presenta efecto antitumoral (H), al retirar el extracto y ponerla en contacto con medio de cultivo fresco, observamos que 48 h después el efecto antitumoral se mantiene y la morfología celular no revierte (I). Como control de citotoxicidad observamos el efecto que provoca el MMS, a 12 h en la línea celular MCF-7 (J) y a las 24 h (K).

Cuando se determinó la DE50 con el método MTT (apartado 13.2 de Materiales y Métodos), observamos que su valor pasó de $0,2 \pm 0,09$, cuando la línea celular 184-A1 (mama sana) era tratada únicamente con el extracto acetónico, a >2 (10% de inhibición), cuando después del tratamiento con el extracto se añadió medio nuevo. Para la línea celular CCD-16Lu (pulmón sano), la DE50 pasó de >2 (39,61%), cuando sólo se trató con el extracto acetónico, a >2 (5% de inhibición), cuando tras el tratamiento con el extracto se añadió medio de cultivo fresco.

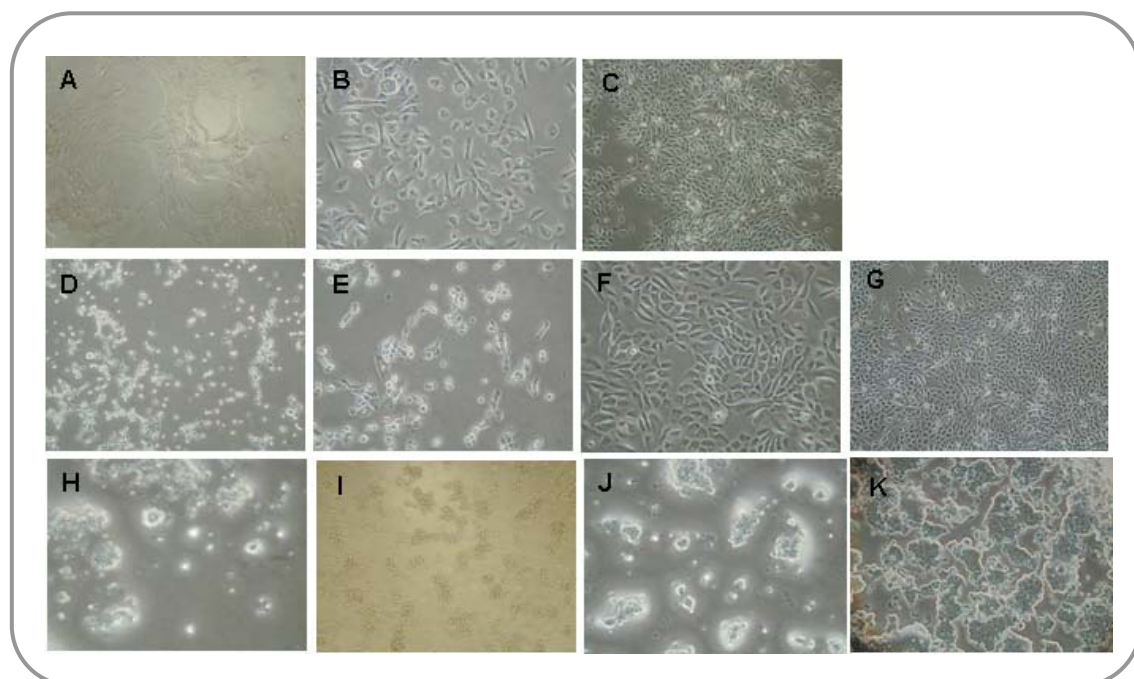


Figura 36. Efecto de reversión morfológica observado en la línea celular 184-A1 (mama sana) y de no reversión en la línea MCF-7 (mama tumoral). Línea 184-A1: 24 h de añadido el extracto acetónico de la cepa IBT 40841 proveniente del cultivo en PDB (A). Inicio de reversión morfológica: 24 h después de agregar el medio de cultivo fresco a la línea 184-A1 tratada con el extracto (B). Morfología celular normal de la línea 184-A1, 48 h después añadir medio de cultivo fresco (C). Efecto citotóxico a las 24 h de tratar con MMS (D). Efecto citotóxico no reversible: 24 h después de agregar medio de cultivo fresco a la línea 184-A1 previamente tratada con MMS (E). Después de 12 h de tratamiento de la línea 184-A1 con DMSO (F). Después de 24 h de tratamiento de la línea 184-A1 con DMSO (G). Efecto antitumoral: después de 12 h de tratamiento de la línea MCF-7 con el extracto acetónico (H). Efecto antitumoral no reversible: 48 h después de añadir medio fresco a la línea MCF-7 previamente tratada con el extracto (I). Control de citotoxicidad: 12 h después de tratar la línea MCF-7 con MMS (J). Después de 24 h de tratar la línea MCF-7 con DMSO (K).

3.2.6.3. Actividad antitumoral y citotoxicidad de los metabolitos secundarios

Se determinó el DRC (índice celular a un tiempo determinado *versus* concentración) o curva sigmoideal de dosis-respuesta, tratando la línea celular de hepatocitos humanos sanos (ZBhu001010) con diferentes concentraciones de trichodermina, tirosol o taxol (control), según el apartado 13.4 de Materiales y Métodos. Transcurridas 48 h, el tirosol presentó una DE50 >1000

μM (*Square R*= 0,89747), la trichodermina una DE_{50} = 12,70 μM (*Square R*= 0,98148) y el taxol una DE_{50} = 0,43 μM (*Square R*= 0,94063). En este sentido, el tirosol no mostró ningún efecto citotóxico frente a esta línea celular, y la trichodermina fué menos citotóxica que el taxol (Figura 37).

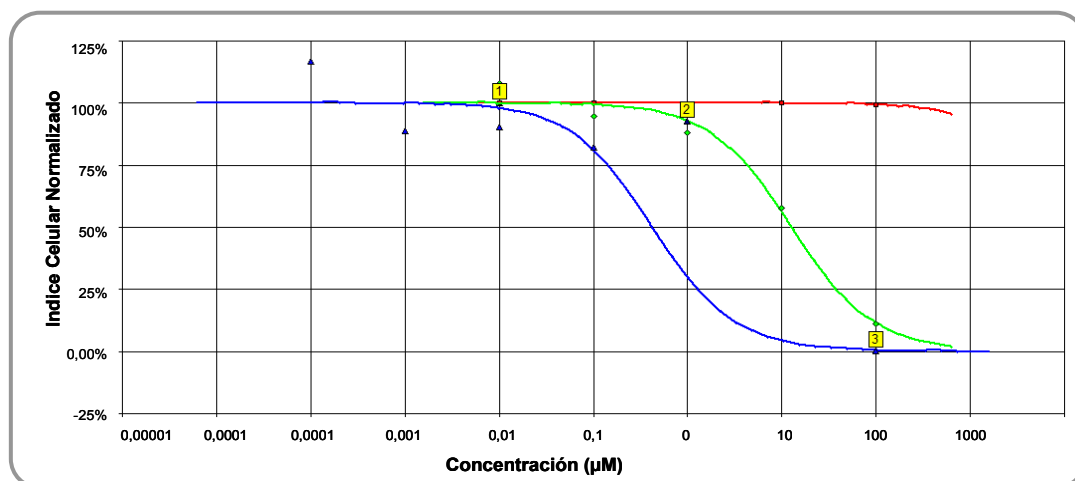


Figura 37. Curva sigmoide de dosis-respuesta o “DRC” de la trichodermina (verde), tirosol (rojo) y taxol (azul) frente a la línea celular de hepatocitos humanos sanos (ZBhu001010). En el eje “y” se representa el índice celular normalizado. En el eje “x” se indica la concentración (μM) de cada metabolito incluido en este estudio. El tirosol presenta una ED_{50} >1000 μM ; la trichodermina ED_{50} = 12,7 μM ; y el taxol ED_{50} = 0,43 μM .

Se determinó la tasa e inicio de citotoxicidad (apartado 13.3 de Materiales y Métodos) con diferentes concentraciones de trichodermina, frente a la línea celular ZBhu001010. Como control se incluyeron diferentes concentraciones de taxol. En la Figura 38 se observa una primera fase de adhesión celular, que dura 24 h, seguida de una fase de estabilización celular, después de 24 h, punto en el que se añade el metabolito (trichodermina o taxol), iniciándose la determinación del índice celular normalizado. Los resultados indican que para la trichodermina, y también para el taxol, la citotoxicidad frente a hepatocitos humanos sanos es dependiente de la dosis. En este sentido, la trichodermina a concentraciones de 10 y 100 μM , y el taxol a 0,1 μM y 100 μM , son más citotóxicos frente a la línea celular ZBhu001010.

Mediante técnicas de fluorimetría o de xCELLigence (Roche Applied Science), se evaluó la actividad antitumoral de la trichodermina, del tirosol y del taxol (control) en cuatro líneas celulares tumorales: A-549, MCF-7, Hep-G2 y Hep-3B (apartados 13.3 y 13.5 de Materiales y Métodos). Se observó que el tirosol no posee actividad antitumoral (DE_{50} >100000 μM) para las líneas tumorales de este estudio. Por otro lado, la trichodermina presentó actividad antitumoral principalmente frente a MCF-7 y Hep-3B, seguido de A-549 y Hep-G2. Sin embargo, la trichodermina posee menor efecto antitumoral que el taxol, frente a las líneas ensayadas (Tabla 16).

Finalmente, se determinó la DE50 de la trichodermina y del taxol frente a la línea celular de hepatocitos humanos sanos ZBhu001010. Observándose que la DE50 de la trichodermina se estabilizó alrededor de las 38 h y la del taxol a las 24 h. Además, la trichodermina presentó menor citotoxicidad frente a esta línea que el taxol (Tabla 16).

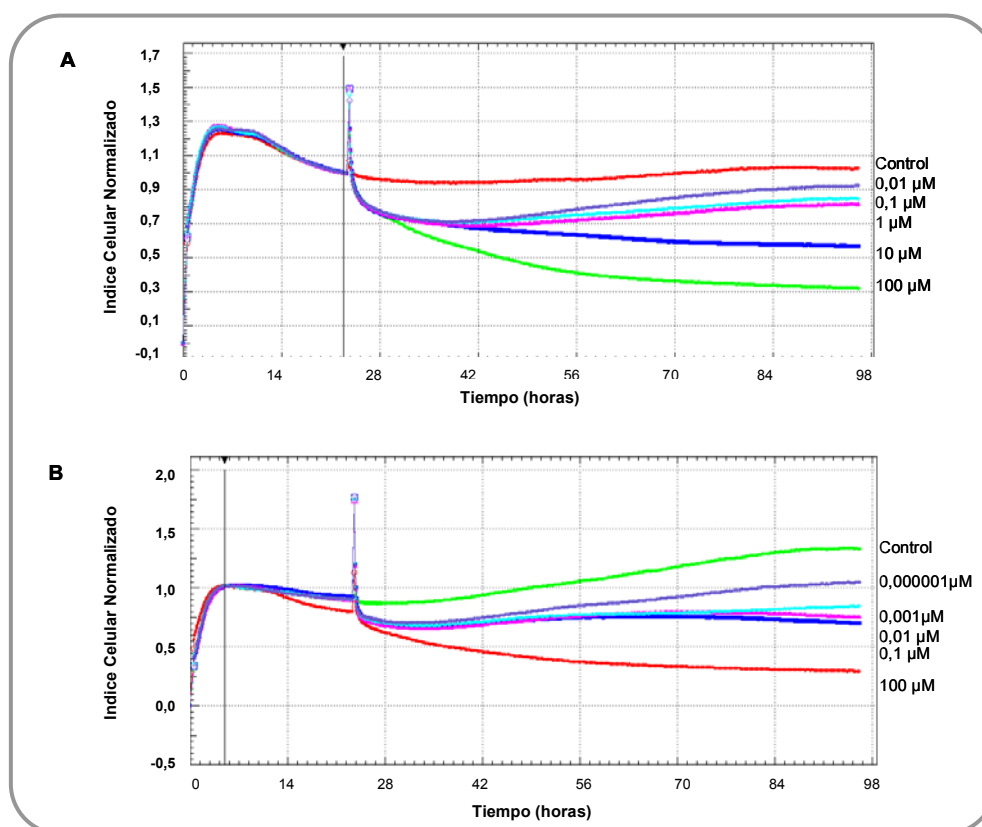


Figura 38. Control dinámico de la tasa y del inicio de citotoxicidad mediada por trichodermina (A) y taxol (B). Los dos metabolitos se ensayaron a cinco concentraciones diferentes. En el eje "y" se representan los valores del índice celular normalizado y en el "x", el tiempo en horas. La fase de adhesión celular corresponde al periodo de tiempo entre 0-24 h, este punto corresponde al punto de aplicación de cada tratamiento (trichodermina o taxol).

Tabla 16. Actividad antitumoral de la trichodermina y del taxol, expresada como DE50 (µM), frente a cuatro líneas celulares tumorales: A-549, MCF-7, Hep-G2 y Hep-3B, y la línea celular hepática sana, ZBhu001010.

Técnica	Línea celular	Trichodermina			Taxol		
		24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Fluorimetría	A-549			4,424±0,327			0,034±0,022
	MCF-7			3,237±0,260			0,018±0,004
	Hep-G2			10,198±0,031			0,004±0,00006
	Hep-3B						
XCELLigence	Hep-G2	9,812±0,059	9,278±0,032	7,431±0,038	0,146±0,052	0,424±0,049	0,226±0,051
	Hep-3B	7,995±0,045	5,157±0,032	3,442±0,042	0,602±0,048	0,339±0,055	0,475±0,057
	ZBhu001010	39,300±10,021	12,300±5,552	9,550±5,553	0,939±0,020	0,430±0,021	0,167±0,034

Líneas celulares: A-549, adenocarcinoma de pulmón; MCF-7, adenocarcinoma de mama; Hep-G2, carcinoma hepatocelular; Hep-3B, carcinoma hepatocelular; ZBhu001010, hepatocitos humanos sanos. Los resultados obtenidos por el método de fluorimetría (alamarblue®-Invitrogen) por definición no son comparables con los del equipo XCELLigence (Roche Applied Science).

3.2.6.4. Mecanismo de acción antitumoral de la trichodermina

El mecanismo de acción de la trichodermina se determinó tratando las líneas celulares tumorales Hep-G2 y Hep-3B con diferentes concentraciones de este metabolito. Se utilizaron como control de muerte celular, células tratadas con 5% de DMSO (control positivo) y, como control de crecimiento, células sin tratar (control negativo). Se observó el mismo patrón de acción antitumoral para ambas líneas celulares. Como ejemplo, la Figura 39 muestra el perfil compuesto-específico en la línea celular Hep-G2 tratada con trichodermina o taxol. Se observó que con tratamiento con 5% de DMSO, el índice celular normalizado es cero, indicando muerte celular. Por otro lado, observamos que la trichodermina a concentraciones de 10 y 100 μM (Figura 39A) es citostática, manteniendo el índice celular normalizado estable hasta las 98 h del análisis. Además, el taxol, a concentraciones 1 y 100 μM , es citotóxico hasta aproximadamente 48 h (Figura 39B), observándose que a partir de este punto las células vivas remanentes empiezan a proliferar.

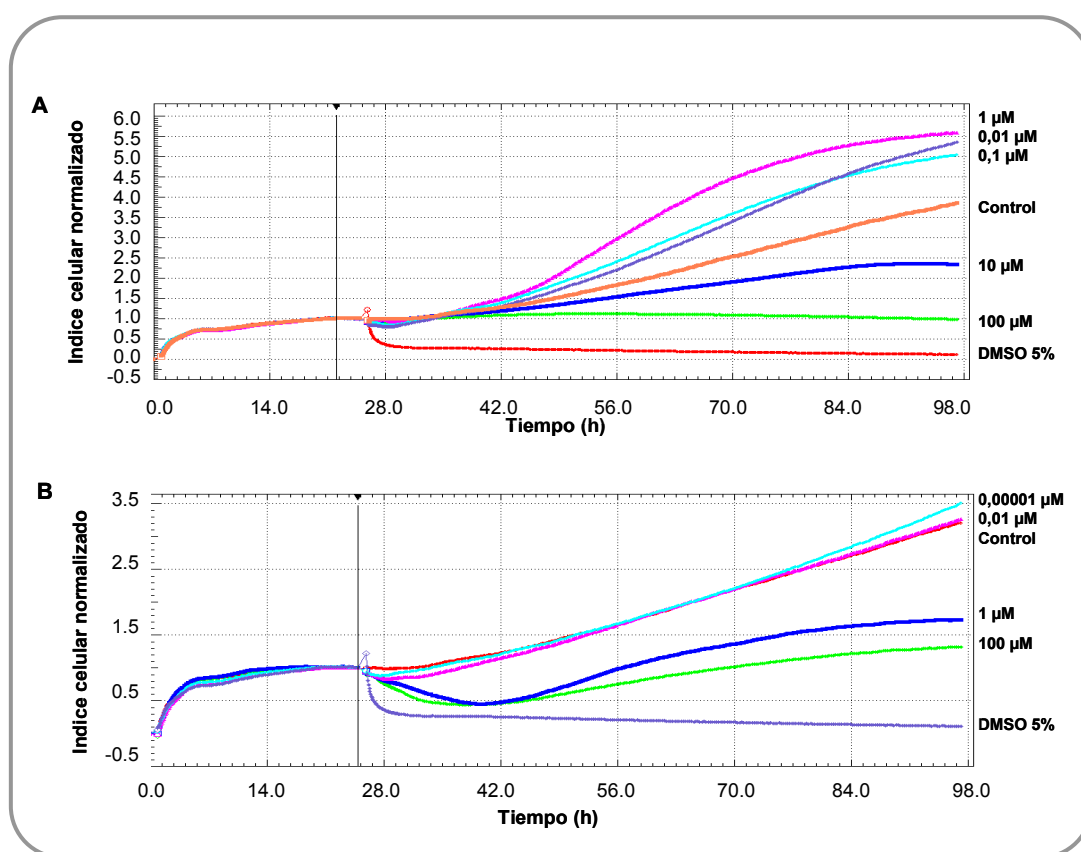


Figura 39. Perfil compuesto-específico (mecanismo de acción antitumoral). Línea celular HEP-G2 tratada con diferentes concentraciones de trichodermina (A), y línea celular HEP-G2 tratada con diferentes concentraciones de taxol (B). En el eje "y" se representa el índice celular normalizado, y en el eje "x" el periodo de tiempo (h). La fase de adhesión celular corresponde al periodo de tiempo entre 0-24 h. La estabilización celular se representa con una línea gris vertical a las 24 h del ensayo, este punto corresponde a la aplicación de cada tratamiento (trichodermina, taxol o DMSO 5%).

Para determinar la eficacia y potencia de la trichodermina sobre las líneas celulares Hep-G2 y Hep-3B, se monitorizó cuantitativamente su proliferación celular tras el tratamiento con este metabolito a diferentes concentraciones. Para la línea celular Hep-3B observamos que la trichodermina a concentraciones de 10 y 100 μM produce un bajo efecto citotóxico, y a concentraciones desde 0,01 a 1 μM el tiempo de duplicación de las células Hep-3B es similar al del control de crecimiento.

Por otro lado, observamos que cuando las células Hep-G2 se tratan con trichodermina a concentraciones de 100 μM , su duplicación dura hasta 676 h, y a 10 μM hasta unas 47,3 h; en comparación con el tiempo de duplicación de las células Hep-G2, que fue 32 h (Figura 40A). Además, a concentraciones menores de trichodermina (0,01-1 μM), se observó que el tiempo de duplicación celular es semejante al control de crecimiento. Por tanto, la trichodermina a concentraciones de 10 y 100 μM es activa como agente antitumoral citostático. Finalmente, las células Hep-G2 tratadas con taxol a sus concentraciones activas (1 y 100 μM) no muestran duplicación celular (Figura 40B).

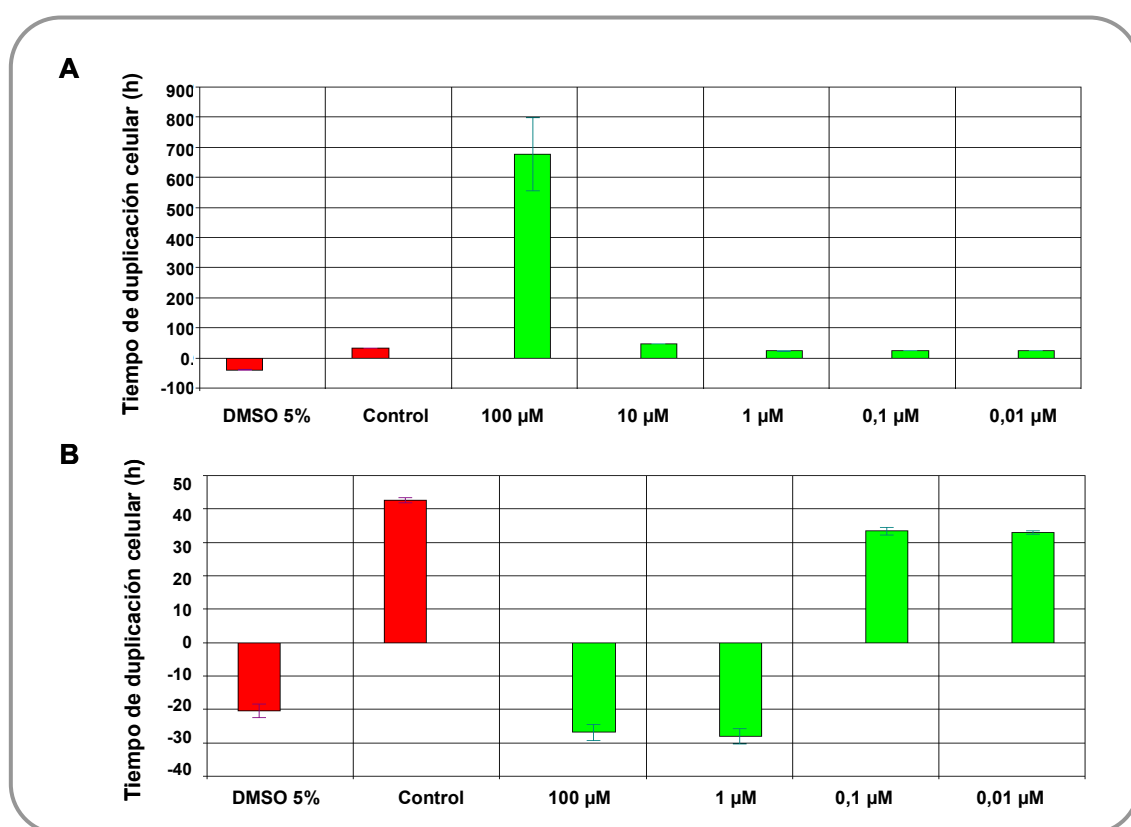


Figura 40. Tiempo de duplicación celular (h) de la línea Hep-G2. Células Hep-G2 tratadas con trichodermina a diferentes concentraciones (A), y células Hep-G2 tratadas con taxol a diferentes concentraciones (B). Control de muerte celular: células tratadas con DMSO 5%. Control de crecimiento celular: células sin tratamiento (segunda barra roja).

3.2.7. Ensayos antifúngicos

3.2.7.1. Ensayo en cultivos duales

Con objeto de conocer si la sobreexpresión del gen *Tbtri5* afectaba a la actividad antifúngica de *T. brevicompactum*, la cepa silvestre y los tres transformantes se enfrentaron en cultivos duales a los fitopatógenos *R. solani*, *B. cinerea* y *P. irregulare*. Ninguna de las cepas de *T. brevicompactum* ensayadas mostró inhibición del crecimiento de estos tres fitopatógenos. Por tanto, el gen *Tbtri5* no parece estar relacionado con la actividad antifúngica del hongo. Por el contrario, las colonias de *Trichoderma* se vieron rodeadas por las colonias de los fitopatógenos. En la Figura 41 se muestran los cultivos duales de las diferentes cepas de *T. brevicompactum* y *R. solani*.

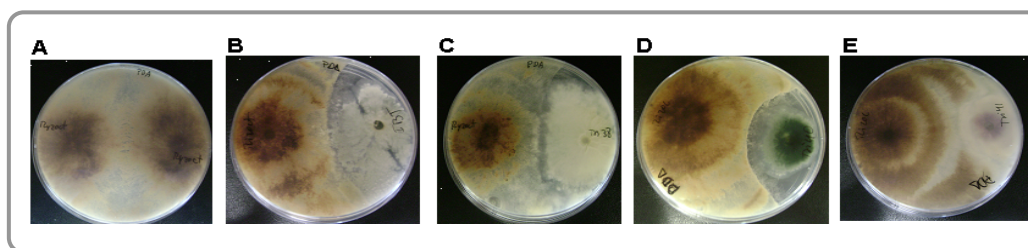


Figura 41. Cultivos duales de *R. solani* (izquierda) y *T. brevicompactum* (derecha), en medio PDA, tras 10 días de incubación a 28°C. *R. solani*-*R. solani* (control) (A), *R. solani*- IBT 40841 (B), *R. solani*- Tb38tri5 (C), *R. solani*- Tb40tri5 (D) y *R. solani*- Tb41TRI5 (E).

3.2.7.2. Ensayos *T. brevicompactum*-tomate-*B. cinerea* "in vivo"

Con objeto de analizar, por un lado, el efecto que tenía *T. brevicompactum* en las lesiones producidas al inocular artificialmente plantas de tomate con el patógeno *B. cinerea*, y por otro, si la sobreexpresión del gen *Tbtri5* afectaba o no a las lesiones provocadas por el patógeno, se realizaron ensayos "in vivo" en los que se incluyeron plantas de tomate, *B. cinerea*, la cepa silvestre de *T. brevicompactum* IBT 40841 y los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5 (apartado 14.2 de Materiales y Métodos).

Para las lesiones producidas por *B. cinerea* en cada condición considerada, se obtuvieron los siguientes resultados, en una escala de severidad de lesiones de 1 a 5 puntos, que son el valor medio de 16 inoculaciones diferentes (Figura 42): control ($2,47 \pm 0,26$ puntos), IBT 40841 ($4,22 \pm 0,35$ puntos), Tb38tri5 ($4,09 \pm 0,41$ puntos), Tb40tri5 ($4,51 \pm 0,22$ puntos) y Tb41tri5 ($4,46 \pm 0,34$ puntos). Las lesiones en las plantas de tomate cuyas semillas había sido pildoradas con la cepa silvestre fueron mayores ($p \leq 0,001$), casi el doble en tamaño, que las de aquellas plantas cuyas semillas fueron pildoradas sólo con agua (control). Las lesiones de plantas cuyas semillas habían sido pildoradas con cualquiera de los tres transformantes de *T.*

brevicompactum también fueron mayores que las del control, observándose diferencias estadísticamente significativas para las condiciones con tratamiento con Tb38tri5 ($p=0,042$) y Tb41tri5 ($p=0,004$). Todos los resultados parecen indicar que ni la cepa de *T. brevicompactum* IBT 40841 ni la sobreexpresión de uno de sus genes, *Tbtri5*, de la ruta de trichothecenos confieren resistencia en tomate frente a *B. cinerea*, más bien, parece que se ve aumentada la sensibilidad de la planta de tomate frente a este patógeno.

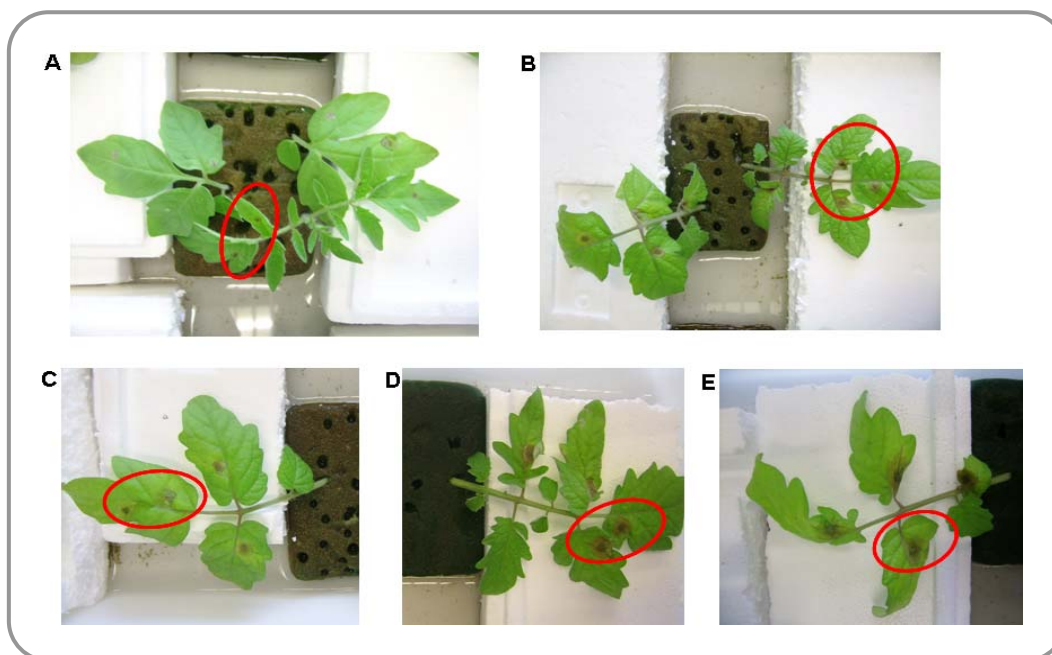


Figura 42. Lesiones producidas al inocular artificialmente *B. cinerea* en plantas de tomate cuyas semillas habían sido pildoradas con agua (control) (A), con *T. brevicompactum* IBT 40841 (B), o con los transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*: Tb38tri5 (C), Tb40tri5 (D) y Tb41tri5 (E).

3.2.8. Ensayos de germinación de semillas

Con objeto de analizar, por un lado, el efecto que tenía *T. brevicompactum* en la germinación de una planta y, por otro, si la sobreexpresión del gen *Tbtri5* afectaba dicha germinación, se realizaron ensayos "in vitro" en los que se evaluó el porcentaje de germinación. Las semillas de tomate se pildoraron con agua, con esporas de la cepa silvestre de *T. brevicompactum* IBT 40841 o con esporas de los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5 (apartado 15.1 de Materiales y Métodos). Para las cinco condiciones consideradas, se obtuvieron los siguientes porcentajes de germinación: agua estéril ($90,6\pm3,6$), esporas de *T. brevicompactum* IBT 40841 ($81,2\pm0$), de Tb38tri5 ($78,1\pm6,4$), de Tb40tri5 (0) y de Tb41tri5 ($53,1\pm7,2$). Observándose, diferencias estadísticamente significativas entre la condición control y las condiciones tratadas con esporas de la cepa silvestre ($p=0,046$), y las tratadas con esporas de los transformantes Tb38tri5 ($p=0,043$), Tb40tri5 ($p=0,023$) y Tb41tri5 ($p=0,043$).

Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la germinación de las semillas de tomate previamente pildoradas con esporas de la cepa silvestre y las pildoradas con esporas de los transformantes Tb38tri5 ($p=0,047$), Tb40tri5 ($p=0,037$) y Tb41tri5 ($p=0,046$). Los resultados indican que *T. brevicompactum* tiene un efecto negativo sobre la germinación de semillas de tomate y, a su vez, que la sobreexpresión de *Tbtri5* también afecta negativamente a la germinación.

3.2.9. Efecto sobre el crecimiento de la planta

Con objeto de analizar también el efecto de *T. brevicompactum* en el crecimiento de plantas y si la sobreexpresión del gen *Tbtri5* influía o no en ese comportamiento, se realizaron ensayos "in vitro" e "in vivo", sobre plantas de tomate, con la cepa silvestre IBT 40841 y con los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5 (apartados 15.2.1 y 15.2.2 de Materiales y Métodos).

3.2.9.1. Ensayo "in vitro"

Después de diez días de incubación "in vitro", en cinco plántulas de tomate, en presencia o no de las diferentes cepas de *Trichoderma*, se midieron los siguientes parámetros: tamaño de la planta, tamaño de la raíz principal y número de raíces secundarias. En la Figura 43 se muestra, como representante de cada una de las condiciones ensayadas, una placa Petri que contiene 5 plántulas de tomate crecidas durante 10 días en presencia o no (control) de las diferentes cepas de *T. brevicompactum*.

El valor medio del tamaño de las plantas fue $4,1\pm 1$ cm cuando se crecieron en presencia de agua (control); $4\pm 0,6$ cm en presencia de la cepa silvestre IBT 40841; $3,7\pm 0,5$ cm con Tb38tri5; $3,8\pm 1$ cm con Tb40tri5; y $3,6\pm 0,4$ cm con Tb41tri5. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de la planta control y las plantas crecidas en presencia de los tres transformantes ($p=0,05$), y a su vez, entre el tamaño de las plantas en presencia de la cepa silvestre y las que estaban en presencia de los transformantes Tb38tri5 ($p=0,046$) y Tb41tri5 ($p=0,045$). Los datos indican que tanto la presencia de *T. brevicompactum* en el medio de crecimiento como la sobreexpresión del gen *Tbtri5* afectan negativamente al tamaño de las plántulas de tomate.

También el tamaño de la raíz principal fue más pequeño cuando las plántulas de tomate se crecieron en presencia de *T. brevicompactum* o de los transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5* respecto al control sin *Trichoderma* en el medio. Los valores medios obtenidos fueron: $6,6\pm 2$ cm en los controles; $5,1\pm 1$ cm con la cepa IBT 40841; $4,8\pm 0,8$ cm con Tb38tri5; $5,9\pm 1,2$ cm con Tb40tri5; y $5,62\pm 1$ cm con Tb41tri5. Finalmente, se observó que el número de raíces secundarias, respecto al control, o no cambiaba o disminuía cuando *T. brevicompactum*

o los transformantes estaban presentes en el medio de crecimiento de las plántulas de tomate. Los valores fueron: $15,93 \pm 8$ cm en el control, $11,53 \pm 5,2$ cm con la cepa silvestre, $11,06 \pm 4,2$ cm con Tb38tri5, $15,86 \pm 4,6$ cm con Tb40tri5 y $14,78 \pm 3$ cm con Tb41tri5. La mayor disminución en el número de raíces secundarias, respecto al control, fue en presencia de la cepa silvestre o del transformante Tb38tri5. En ambas determinaciones (tamaño de raíz primaria y número de raíces secundarias), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la condición control y las condiciones que contienen *Trichoderma* ($p \leq 0,05$), y a su vez, entre la condición tratada con esporas de la cepa silvestre, y las tratadas con esporas los tres transformantes ($p = 0,05$).

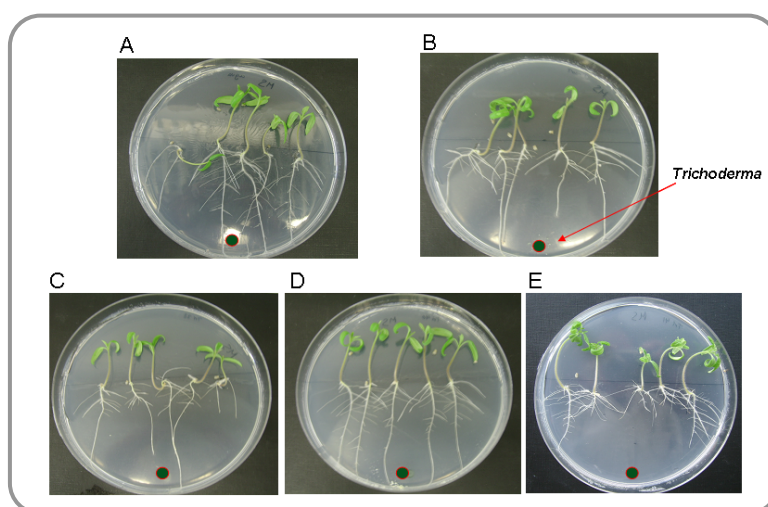


Figura 43. Plántulas de tomate después de diez días de incorporar al medio de crecimiento agua (control) (A), *T. brevicompactum* IBT 40841 (B), Tb38tri5 (C), Tb40tri5 (D) o Tb41tri5 (E).

3.2.9.2. Ensayo “*in vivo*”

Se evaluó el efecto que tenía tanto *T. brevicompactum* como la sobreexpresión del gen *Tbtri5* en el crecimiento de plantas de tomate mediante ensayos “*in vivo*”. La metodología está descrita en el apartado 15.2.2 de Materiales y Métodos. En la Figura 44 se muestran imágenes del ensayo realizado en el invernadero para las cinco condiciones consideradas: control, cepa silvestre IBT 40841 y los tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*. Cuando las semillas se habían pildorado con agua germinaron el $82,4 \pm 3\%$ de las mismas y el tamaño medio de las plantas fue de $18,3 \pm 0,8$ cm. Cuando se utilizó la cepa silvestre o los transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, para pildorar las semillas de tomate, disminuyeron los porcentajes de germinación y las plantas tuvieron menor tamaño. Los resultados del porcentaje de germinación y del tamaño de las plantas fueron, respectivamente: $42,85 \pm 3,5\%$ y $16,5 \pm 2$ cm, para la cepa silvestre IBT 40841; $57,14 \pm 2,06\%$ y $16,8 \pm 1,5$ cm, con la cepa Tb38tri5; $42,85 \pm 2,5\%$ y $16,7 \pm 2$ cm, para la cepa Tb40tri5; y, $28,57 \pm 2,1\%$ y $10,8 \pm 3$ cm,

para la cepa Tb41tri5. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de germinación de las semillas de tomate del control respecto al porcentaje de germinación de las semillas tratadas con esporas de la cepa silvestre ($p=0,05$), y las tratadas con esporas de los tres transformantes ($p=0,046$). Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de plantas germinadas, cuyas semillas habían sido previamente pildoras con esporas de la cepa silvestre, y el tamaño de las plantas previamente tratadas con esporas de los transformantes Tb38tri5 ($p=0,048$) y Tb41tri5 ($p=0,042$). En cuanto al tamaño de las plantas de tomate, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la condición control y las plantas de tomate cuyas semillas habían sido previamente tratadas con esporas de *Trichoderma*: IBT 40841 ($p=0,046$), Tb38tri5 ($p=0,043$), Tb40tri5 ($p=0,042$) y Tb41tri5 ($p=0,036$). Entre los tratamientos con *Trichoderma*, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de las plantas tratadas con esporas de la cepa silvestre y las tratadas con esporas del transformante Tb41tri5 ($p=0,05$).

Los resultados parecen indicar que *T. brevicompactum* afecta negativamente al crecimiento de las plantas de tomate. Ya que los más bajos porcentajes de germinación y de tamaño de las plantas se midieron en la condición de semillas pildoradas con el transformante Tb41tri5, el que mostró los mayores niveles de transcrito del gen *Tbtri5*. Parece que la sobreexpresión de este gen tiene efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas de tomate.

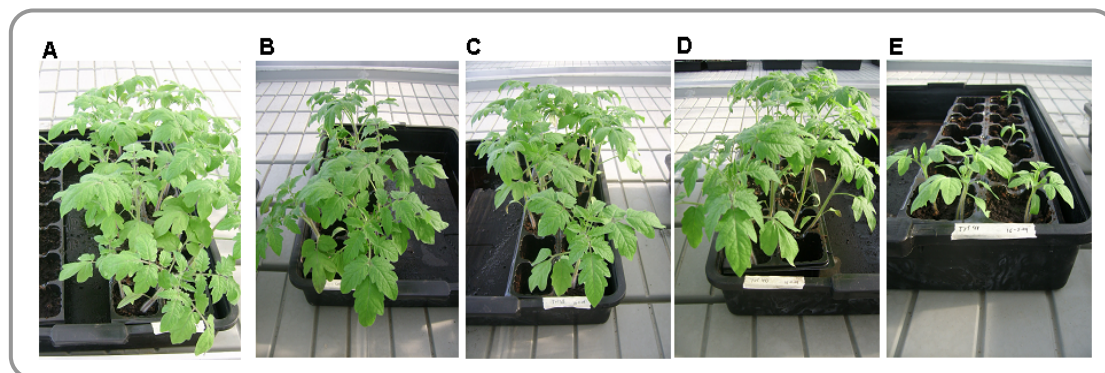


Figura 44. Plantas de tomate de cuatro semanas crecidas bajo condiciones de invernadero a partir de semillas pildoradas con agua (control) (A), esporas de *T. brevicompactum* IBT 40841 (B), esporas de Tb38tri5 (C), esporas de Tb40tri5 (D) o esporas de Tb41tri5 (E).

4. ANÁLISIS DEL CLUSTER DE GENES *tri* EN *T. brevicompactum* IBT 40841

Para estudiar el tamaño y la disposición de los genes *tri* en la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841, se utilizó la secuencia completa del *cluster* de genes *tri* implicados en la ruta biosintética de trichotecenos de *T. arundinaceum* IBT 40837, resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación y que aún no están publicados. Con ese objetivo, se diseñaron estratégicamente parejas de oligonucleótidos que cubrían los siete genes y las seis regiones intergénicas que constituyen el *cluster* (Tabla 5).

En la Figura 45 se muestran los tamaños de los productos de PCR amplificados a partir de ADN genómico de *T. brevicompactum* IBT 40841 y de *T. arundinaceum* IBT 40837 con cada una de las parejas de oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia disponible para esta última cepa. Las parejas Tri14-F y Tri14-R, Tri12-F y Tri12-R, Tri11-F y Tri11-R, Tri10-F y Tri10-R, Tri3-F y Tri3-R, Tri6-F y Tri6-R, amplificaron fragmentos de tamaño similar en ambas cepas que correspondían, con la información disponible, a los genes *tri14*, *tri12*, *tri11*, *tri10*, *tri3* y *tri6*. Sin embargo, los oligonucleótidos Tri4-F y Tri4-R, diseñados sobre el gen *tri4* de *T. arundinaceum*, amplificaron un producto de PCR de aproximadamente 1800 pb en esta cepa pero de un tamaño inferior, sobre 1100 pb, en *T. brevicompactum*. Además, el tamaño de las regiones espaciadoras entre los genes *tri* se mantenía muy conservado entre las cepas de las dos especies, a excepción de las situadas entre los genes *tri12* y *tri11*, y entre *tri4* y *tri6* donde se observó polimorfismo en los tamaños de los productos de PCR amplificados a partir del ADN de ambas cepas: *tri12-tri11*, 1782 pb en *T. arundinaceum*, y aproximadamente 3000 pb en *T. brevicompactum*; y *tri4-tri6*, 2373 bp en *T. arundinaceum*, y aproximadamente 2200 pb en *T. brevicompactum*.

Los productos de PCR correspondientes a los genes *tri4*, *tri6* y *tri14* de *T. brevicompactum* se purificaron a partir del gel de agarosa y se secuenciaron directamente, utilizando oligonucleótidos internos para avanzar en la secuencia cuando fue necesario. La secuencia nucleotídica de los genes *tri4*, *tri6* y *tri14* de la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 se recoge en el apéndice de esta memoria. Los genes *tri14* y *tri6*, de 1151 y 657 pb, respectivamente, estaban muy conservados en ambas cepas. Sin embargo, la secuencia confirmó que el gen *tri4* tenía un tamaño de 1191 pb en *T. brevicompactum*, 1791 pb en *T. arundinaceum*, y que existía polimorfismo en ese gen entre ambas cepas.

Debido al polimorfismo de tamaño observado en ambas cepas para los productos amplificados correspondientes a la región que separa los genes *tri12* y *tri11*, los productos de PCR amplificados sobre esta región con el ADN de *T. brevicompactum*, se purificaron del gel y se secuenciaron, utilizando oligonucleótidos internos para avanzar en la secuencia. Sin embargo, sólo se logró secuenciar 842 pb de esa región.

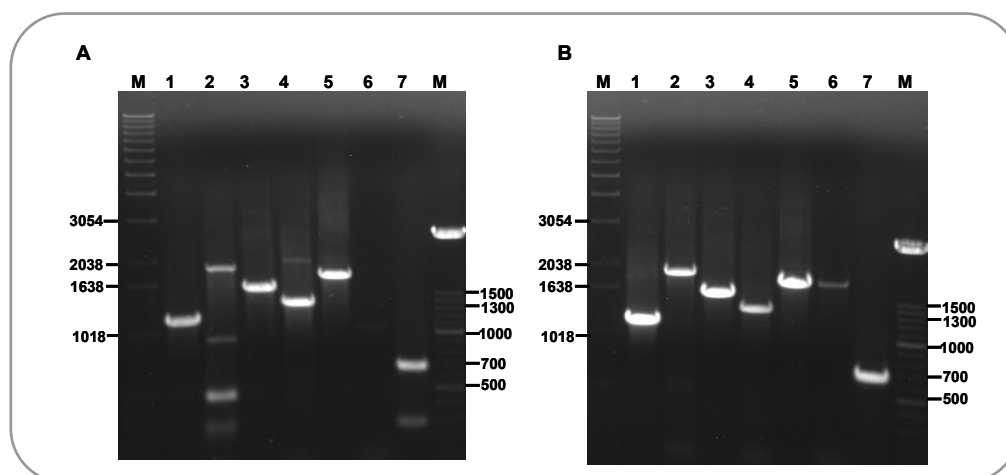


Figura 45. Productos de PCR obtenidos a partir de amplificaciones de ADN genómico de *T. brevicompactum* IBT 40841 (A) y *T. arundinaceum* IBT 40837 (B) con los oligos Tri14-R y Tri14-F (carril 1), Tri12-F y Tri12-R (carril 2), Tri11-F y Tri11-R (carril 3), Tri10-F y Tri10-R (carril 4), Tri3-F y Tri3-R (carril 5), Tri 4-F y Tri 4-R (carril 6), Tri6-F y Tri6-R (carril 7). M: marcador X ladder (Roche Applied Science) (izquierda). M: marcador XIV ADN ladder (Roche Applied Science) (derecha).

La Figura 46 muestra una propuesta de cómo se dispondría en *T. brevicompactum* IBT 40841 el *cluster* de los genes *tri*.

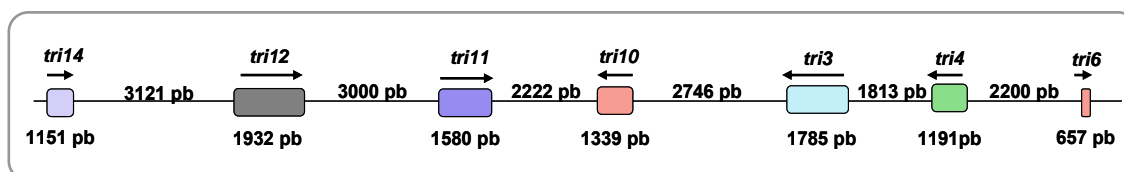


Figura 46. Disposición de los genes *tri* en *T. brevicompactum* IBT 40841. En la figura se muestra el tamaño de los genes y de las regiones intergénicas en pb. Las flechas indican la dirección de la transcripción de los genes. En rosa se indican los dos genes implicados en la regulación del grupo de genes *tri*.

Al realizar una comparación del *cluster* de genes *tri* de la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 con los *clusters* de genes publicados para *F. sporotrichoides* y *F. graminearum* (Brown y col., 2003), se observa que la disposición de los genes *tri* es diferente en *Trichoderma* y en *Fusarium*. Además, en la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 el gen *Tbtri5* no se encontró dentro del *cluster* de genes *tri*, como se ha descrito para las especies de *Fusarium* (Figura 47).

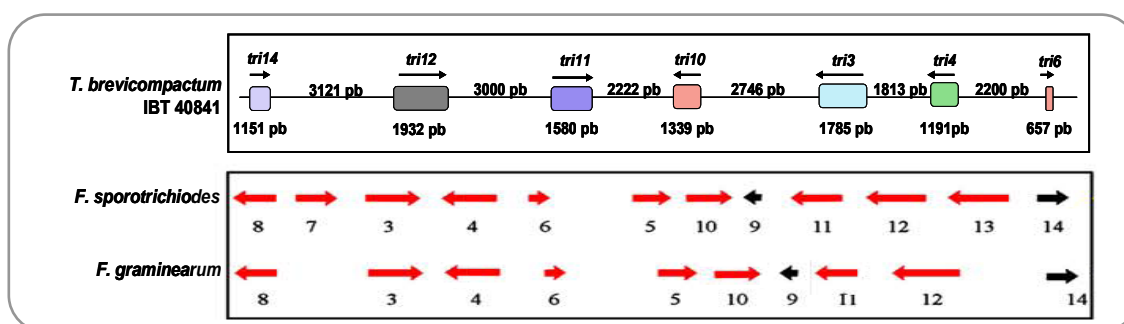


Figura 47. Comparación del *cluster* de genes *tri* de *T. brevicompactum* IBT 40841 con el de *F. sporotrichoides* y *F. graminearum*.

4.1. Efecto de la sobreexpresión del gen *Tbtri5* en la expresión de otros genes de la ruta biosintética de los trichotecenos

Con objeto de conocer cómo afectaba la sobreexpresión del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841 a la expresión de otros genes de la ruta de biosíntesis de trichotecenos, se analizó, mediante *Real-time* PCR, la expresión de siete genes de esta ruta, con ARN total extraído a partir de micelios de la cepa silvestre IBT 40841 y de los tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, incubados en medio MM (Penttilä y col., 1987), suplementado con glucosa al 2%, durante 3 días (apartado 4.1.3 de Materiales y Métodos). Los siete genes cuya expresión se analizó en este estudio fueron: *tri4*, relacionado con la biosíntesis de trichodermina; *tri3* y *tri11*, relacionados con la síntesis de la toxina tipo T2; *tri6* y *tri10*, reguladores de la ruta; *tri12*, relacionado con la autoprotección; y *tri14*, que delimita el *cluster*.

El ARN total se retrotranscribió utilizando oligo (dT)₁₅ (apartado 8.3.2 de Materiales y Métodos). El ADNc, así generado, se utilizó como molde en diferentes reacciones de PCR. Los oligonucleótidos, recogidos en la Tabla 5 de Materiales y Métodos, se diseñaron en la zona central de cada gen *tri*. Como control interno se utilizó el gen que codifica la β -tubulina, usando los oligos Tub-r y Tub-f.

En la Figura 48 se muestran los valores de expresión para los diferentes genes *tri* en la cepa silvestre IBT 40841 y en los transformantes Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5. Los mayores niveles de expresión de los genes *tri* se observaron en el transformante Tb41tri5, excepto para el gen *tri14* donde los valores fueron ligeramente inferiores a los detectados en la cepa silvestre. Por otro lado, los valores de expresión de los genes *tri3*, *tri4*, *tri11*, *tri12* y *tri14* en el transformante Tb38tri5 fueron similares o inferiores a los detectados en la cepa silvestre. No se observaron grandes diferencias en los niveles de expresión de los genes *tri3*, *tri11*, *tri12* y *tri14* entre la cepa silvestre y el transformante Tb40tri5 pero la expresión del gen *tri4* fue superior en el transformante. En el caso de los dos genes reguladores, *tri6* y *tri10*, la expresión fue siempre mayor en los transformantes que en la cepa silvestre; observándose las mayores diferencias, respecto a la cepa silvestre, en los valores de expresión del *tri10* de los transformantes Tb40tri5 y Tb41tri5.

Por otro lado, se analizó como afectaba a la expresión de los genes *tri4*, *tri6* y *tri10*, relacionados con la biosíntesis de trichodermina y su regulación, en la cepa silvestre y en los tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, en presencia de un agente antioxidante como el tirosol adicionado al medio. Los diferentes hongos se crecieron en el medio MM (Penttilä y col., 1987), sin glucosa y suplementado con 0,25 ó 5 mM de tirosol, durante 1 ó 3 días (apartado 4.1.3 de Materiales y Métodos). Los valores de expresión de los genes *tri4*, *tri6* y

tri10 para las diferentes cepas, incubadas en presencia de las distintas cantidades de tirosol, se muestran en las Figuras 49, 50 y 51.

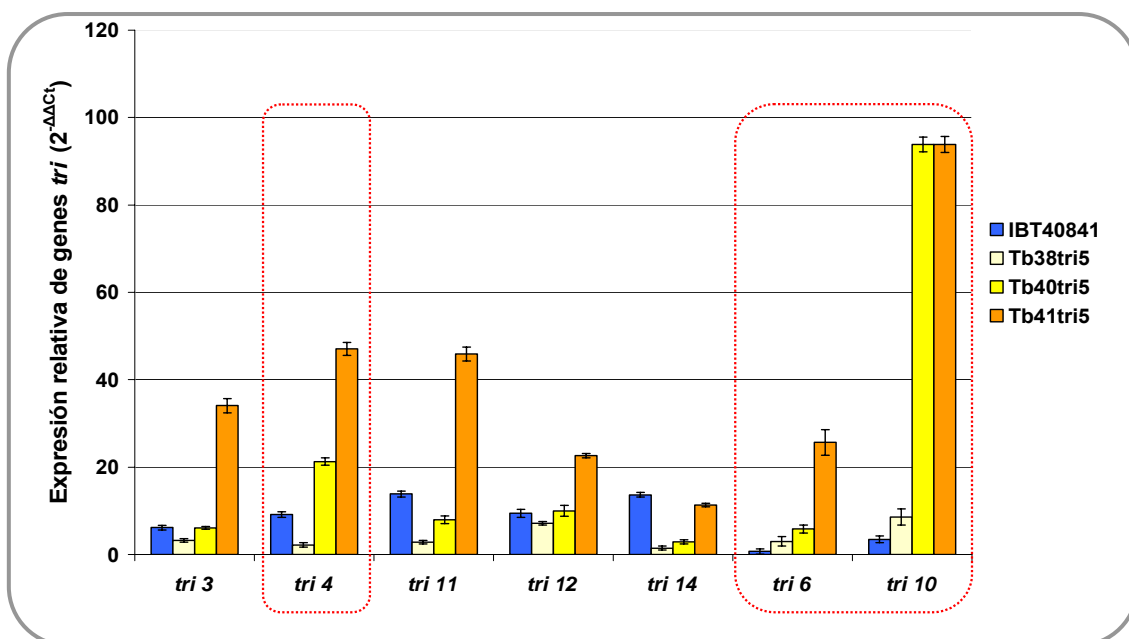


Figura 48. Análisis de la expresión de siete genes de la ruta biosintética de los trichotecenos (genes *tri*), mediante *Real-time* PCR, en la cepa silvestre *T. brevicompactum* IBT 40841 y en tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5. Las cepas se incubaron durante 3 días en MM (Penttilä y col., 1987), suplementado con glucosa al 2%. Se tomó como valor de la condición basal, MM sin glucosa, $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$

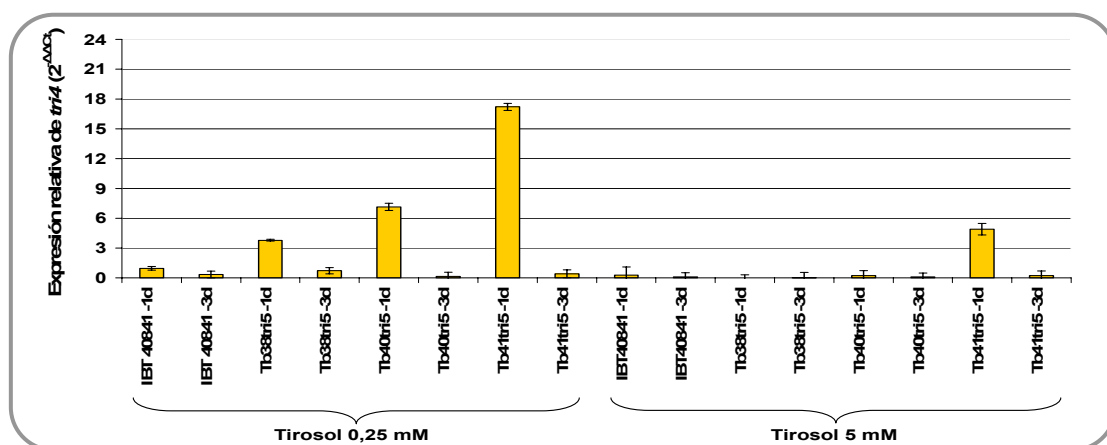


Figura 49. Valores de expresión del gen *tri4*, obtenidos a partir de *Real-time* PCR, en la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 y en tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, incubados en presencia de tirosol. Las cepas se incubaron, durante 1 ó 3 días, en MM (Penttilä y col., 1987), con 0,25 ó 5 mM de tirosol. Se tomó como valor de la condición basal, MM sin glucosa, $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$.

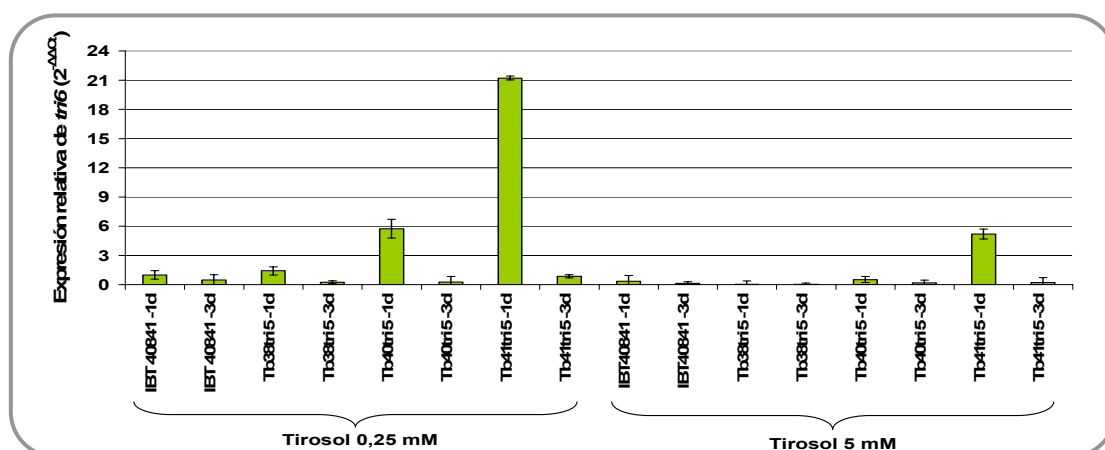


Figura 50. Valores de expresión del gen *tri6*, obtenidos a partir de *Real-time* PCR, en la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 y en tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, *Tb38tri5*, *Tb40tri5* y *Tb41tri5*, incubados en presencia de tirosol. Las cepas se incubaron, durante 1 ó 3 días, en MM (Penttilä y col., 1987), con 0,25 ó 5 mM de tirosol. Se tomó como valor de la condición basal, MM sin glucosa, $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$.

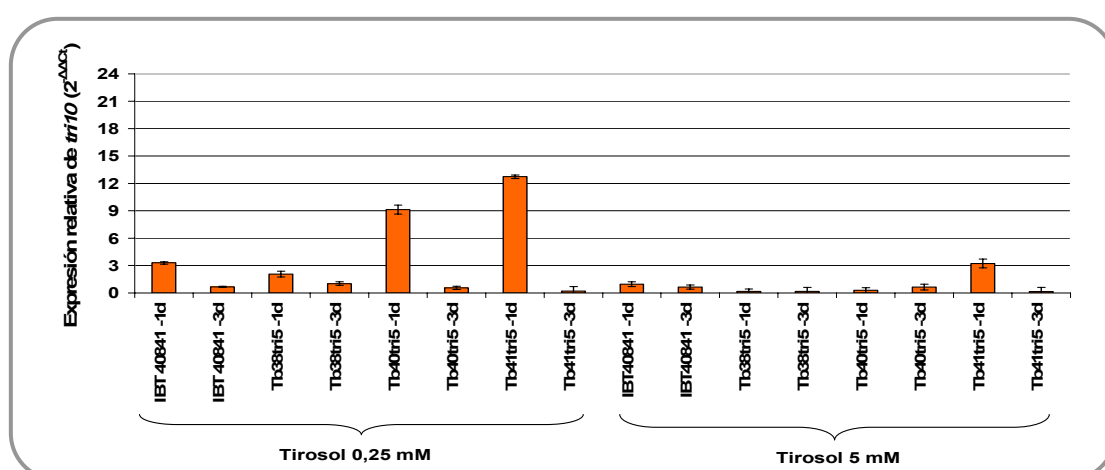


Figura 51. Valores de expresión del gen *tri10*, obtenidos a partir de *Real-time* PCR, en la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 y en tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, *Tb38tri5*, *Tb40tri5* y *Tb41tri5*, incubados en presencia de tirosol. Las cepas se incubaron, durante 1 ó 3 días, en MM (Penttilä y col., 1987), con 0,25 ó 5 mM de tirosol. Se tomó como valor de la condición basal, MM sin glucosa, $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$.

Como se observa en las Figuras 49, 50 y 51, para cada una de las cepas incluidas en el estudio, el perfil de expresión de *tri4*, *tri6* y *tri10* fue similar a las dos concentraciones de tirosol ensayadas. De forma general, en las cuatro cepas, los tres genes mostraron mayores niveles de expresión tras 1 día de crecimiento en presencia de tirosol que tras 3 días de crecimiento. Además, la expresión de los genes fue mayor cuando se utilizaron cantidades menores de tirosol. Las mayores diferencias en los niveles de expresión de estos genes se observaron entre la cepa silvestre y los transformantes *Tb40tri5* y *Tb41tri5* en los cultivos de 1 día en presencia de 0,25 mM de tirosol.

4.2. Efecto de la sobreexpresión del gen *Tbtri5* en la expresión de un gen de la ruta biosintética de ergosterol, el *erg1*

Con objeto de estudiar cómo la sobreexpresión de un gen de la ruta de los trichotecenos podía afectar a la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de otros terpenos, se analizó en la cepa silvestre y en los tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, la expresión del gen *erg1*, que codifica una escualeno epoxidasa implicada en la ruta biosintética de triterpenos como el ergosterol. Los niveles de expresión de *erg1* se analizaron mediante *Real-time* PCR tras incubar los hongos, durante 3 días, en medio MM (Penttilä y col., 1987), suplementado con glucosa al 2%, (apartado 4.1.3 de Materiales y Métodos).

El ARN total se retrotranscribió utilizando oligo (dT)₁₅ (apartado 9.3.2 de Materiales y Métodos). El ADNc, así generado, se utilizó como molde en diferentes reacciones de PCR. Los oligonucleótidos, recogidos en la Tabla 5 de Materiales y Métodos, se diseñaron en la zona central del gen *erg1*. Como control interno se utilizó el gen que codifica la β -tubulina, usando los oligos Tub-r y Tub-f.

En la Figura 52 se muestran los valores de la expresión de *erg1* en la cepa silvestre, *T. brevicompactum* IBT 40841, y en los tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5. Se observaron mayores niveles de expresión de *erg1* en los transformantes Tb40tri5 y Tb41tri5 que en la cepa silvestre, cuando se incubaron bajo idénticas condiciones de crecimiento.

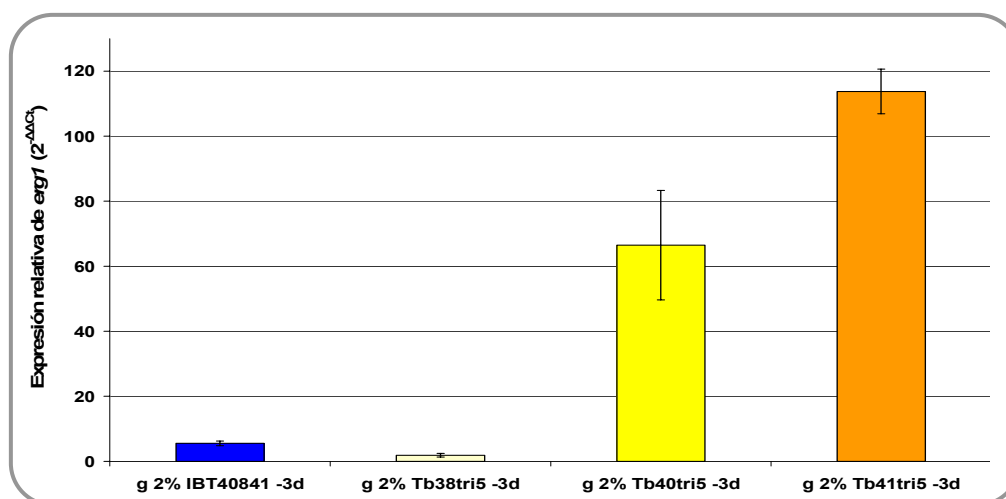


Figura 52. Análisis de la expresión del gen *erg1*, relacionado con la ruta biosintética de triterpenos, mediante *Real-time* PCR, en la cepa silvestre *T. brevicompactum* IBT 40841 y en tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5. Las cepas se incubaron durante 3 días en MM (Penttilä y col., 1987), suplementado con glucosa al 2%. Se tomó como valor de la condición basal, MM sin glucosa, $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$.

Por otro lado, se analizó cómo afectaba a la expresión de *erg1*, en la cepa silvestre y en los tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, la presencia de un agente antioxidante en el medio como es el tirosol. Los diferentes hongos se crecieron en el medio MM (Penttilä y col., 1987), sin glucosa y suplementado con 0,25 mM de tirosol, durante 1 ó 3 días (apartado 4.1.3 de Materiales y Métodos).

Los valores de expresión del gen *erg1* para las diferentes cepas, incubadas en presencia de tirosol, se muestran en la Figura 53. Tanto en la cepa silvestre como en las tres cepas transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, la expresión de *erg1* disminuye en presencia de tirosol 0,25 mM. Las mayores diferencias en los niveles de expresión del gen *erg1* en presencia de 0,25 mM de tirosol respecto a la ausencia de tirosol en el medio de cultivo se observaron en el transformante Tb41tri5.

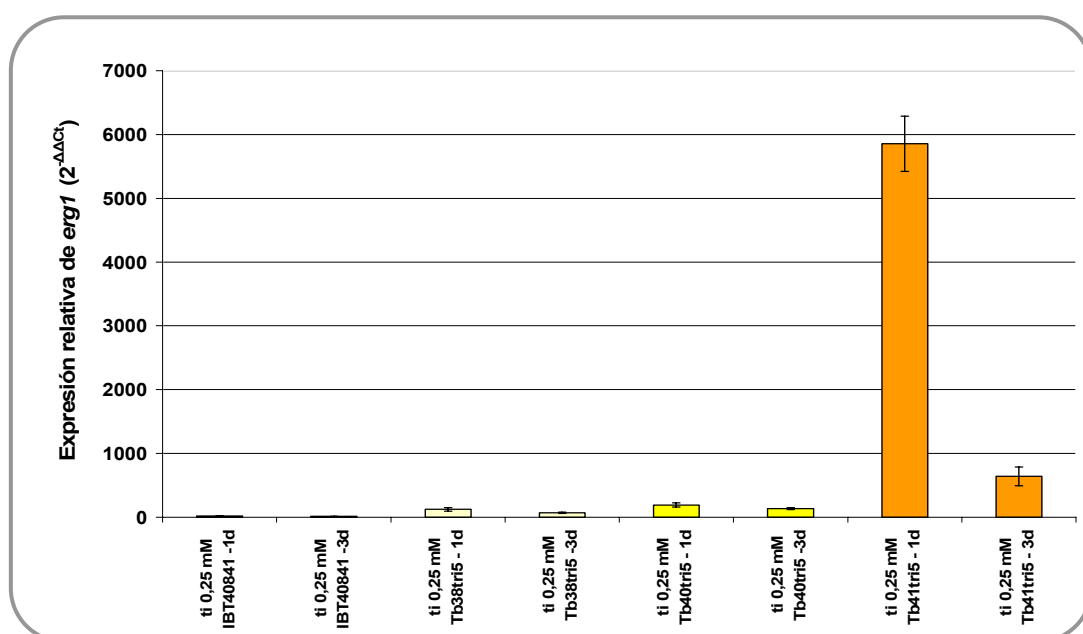


Figura 53. Valores de expresión del gen *erg1*, relacionado con la ruta biosintética de triterpenos, obtenidos a partir de *Real-time* PCR, en la cepa *T. brevicompactum* IBT 40841 y en tres transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, Tb38tri5, Tb40tri5 y Tb41tri5, incubados en presencia de tirosol. Las cepas se incubaron, durante 3 días, en MM (Penttilä y col., 1987), sin glucosa y con 0,25 mM de tirosol (ti). Se tomó como valor de la condición basal, MM sin glucosa, $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$.

DISCUSIÓN

Desde hace varias décadas, diferentes cepas del género *Trichoderma* se vienen utilizando con éxito en el control biológico de hongos fitopatógenos en ambiente natural (Monte, 2001). En la actualidad, el conocimiento que se tiene de las especies de *Trichoderma* es posiblemente superior al alcanzado en cualquier otro género de hongos. Se han secuenciado tres genomas (*T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens*) y los conocidos problemas de identificación morfológica, debidos a la enorme simplicidad fenotípica de este género, se han resuelto con la aplicación de distintas herramientas moleculares que han permitido la delimitación de especies de *Trichoderma* y de su estado teleomórfico (sexual), el ascomiceto *Hypocrea*, en distintos grupos o *clades* taxonómicos (Druzhinina y Kubicek, 2005; Samuels, 2006). La cepa IBT 40841, utilizada en el presente trabajo, pertenece a la especie *T. brevicompactum* y fue propuesta por Kraus y col. (2004) como una especie filogenéticamente distinta a las pertenecientes a los *clades* VIRIDE y LUTEA, siendo representativa de un nuevo *clade* denominado BREVICOMPACTUM (Degenkold y col., 2008a) que, con la excepción de *Hypocrea rodmanii*, se caracteriza porque todos sus miembros son productores de trichotecenos sencillos altamente tóxicos. Curiosamente las cepas *T. harzianum* ATCC 90237 y *T. viride* LEO ND 8, productoras de trichotecenos, fueron reclasificadas como *T. arundinaceum* y *T. brevicompactum*, respectivamente, dentro de este *clade* BREVICOMPACTUM (Degenkold y col., 2008a). El hecho de producir metabolitos muy tóxicos debería invalidar a las especies de BREVICOMPACTUM para su uso como agentes de biocontrol, pero ha sido su capacidad para producir estos sesquiterpenos tóxicos, muy parecidos a los de *Fusarium* (Desjardins y col., 1993), y a que disponíamos de conocimientos previos de la ruta biosintética de compuestos terpénicos por otras especies de *Trichoderma* (Cardoza y col., 2006b y 2007), lo que nos ha movido a abordar el estudio de la biosíntesis de sesquiterpenos en *T. brevicompactum* porque, además, es escasa la información sobre cómo *Trichoderma* sintetiza y regula la producción de estos metabolitos.

Varios trabajos realizados en especies de *Fusarium* muestran que la biosíntesis de trichotecenos involucra una ruta compleja de oxigenaciones, ciclaciones y esterificaciones, en la que están implicados diferentes genes organizados en un *cluster* de 26 kb (Brown y col., 2004; Kimura y col., 2007). En este sentido, se ha descrito en *Fusarium* spp. que uno de los pasos críticos en la ruta de síntesis de trichotecenos está catalizado por una trichodieno sintasa, codificada por el gen *tri5*. La enzima es miembro del grupo de las terpeno ciclasas y cataliza la isomerización y ciclación del farnesil pirofosfato (FPP) para formar trichodieno, un posible sitio de regulación en la ruta biosintética de sesquiterpenos (trichotecenos), diterpenos y triterpenos (Rynkiewicz y col., 2001). Algunos autores han propuesto que distintas especies de *Trichoderma* pueden producir trichotecenos pero en la mayoría de esos estudios la metodología analítica no fue suficientemente específica, ya que únicamente en el *clade* BREVICOMPACTUM se han detectado trichotecenos sencillos: *harzianum* A y *trichodermina*; con una ruta biosintética común desde farnesil pirofosfato a trichodieno, a trichodiol y a trichodermol, el punto de divergencia para *harzianum* A, en *T. arundinaceum*, *T. turrialbense* y

T. protrudens, y para trichodermina, en *T. brevicompactum* (Degenkold y col., 2008a). Aunque un gen *tri5* de una trichodieno sintasa putativa se aisló en *T. arundinaceum* (Gallo y col., 2004), el trabajo recogido en esta tesis doctoral constituye el primer aislamiento y caracterización funcional de un gen que codifica una trichodieno sintasa de *Trichoderma*, en particular, el gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum*, que está implicado en la producción de trichodermina.

Para aislar el gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* IBT 40841 se utilizó una genoteca de ADN genómico de esta cepa y para su escrutinio se usó una sonda heteróloga obtenida por PCR de *T. arundinaceum* ATCC 90237 (Gallo y col., 2004). *Tbtri5* comparte un 99 y un 60% de identidad de secuencia aminoacídica, y un 93 y un 64% de identidad de secuencia nucleotídica con el gen *tri5* de *T. arundinaceum* y *Fusarium* spp., respectivamente. La similitud nucleotídica observada en los genes *tri5* de *Trichoderma* permitió el aislamiento de *Tbtri5* utilizando una sonda heteróloga. En la secuencia del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* se detectó un intrón de 59 pb, tamaño comprendido dentro del rango de 57 a 60 pb observado para intrones del gen *tri5* en otros hongos (Hohn y Plattner, 1989; Gallo y col., 2004). Además, la secuencia del intrón comienza en GTAAC, termina en TAG y contiene el motivo interno TGCTAACA, que se ajusta a la secuencia consenso de procesamiento YGCTAACN, la cual ha sido previamente descrita en intrones de hongos filamentosos (Gurr y col., 1987; Ramboseck y col., 1987).

La traducción del ORF del gen, 1226 pb, dio una secuencia de 388 aminoácidos que corresponden a una proteína de un peso molecular teórico de 44,93 kDa y un punto isoelectrico teórico (pI) de 5,26. Estas características son similares a las observadas en trichodieno sintasas de *Fusarium* (40-60 kDa, pI=5,37) (Cane y Bowser, 1999; Rynkiewicz y col., 2001). El análisis *in silico* de la proteína TbTRI5, determinó una ubicación citoplasmática con una probabilidad del 65,2%. No se detectó la presencia de péptido señal, sin embargo, se encontró un prepro-péptido dentro de la secuencia de TbTRI5. En este sentido, la presencia de un péptido señal se ha relacionado con un alto grado de hidrofobicidad al inicio de la secuencia aminoacídica de la proteína (Matoba y Ogrydziak, 1998), hecho que no coincide con el perfil hidropático de TbTRI5 al inicio de su secuencia. Por otro lado, las trichodieno sintasas pertenecen a la familia de las terpeno ciclasas, que se caracterizan por un predominio de una estructura de plegamiento hélice α antiparalelo (Rynkiewicz y col., 2001), disposición que coincide con los resultados obtenidos en el análisis *in silico* de la estructura secundaria de TbTRI5 en la que predominaban las regiones en hélice α (24) frente a las regiones en hoja plegada β (4).

Ya que Rynkiewicz y col. (2001) habían demostrado que la trichodieno sintasa comparte similitud estructural, altamente significativa, con otras sesquiterpeno sintasas, independientemente de que carecieran de una identidad de secuencia significativa. El alineamiento de proteínas TRI5 mostró que TbTRI5 posee las tres regiones conservadas relacionadas con el centro catalítico de terpeno ciclasas, que la región N-terminal está menos

conservada y, como había sido descrito para la proteína TRI5 putativa de *T. arundinaceum* (Gallo y col., 2004), una secuencia de 9 aminoácidos de la región N-terminal estaba ausente en otras trichodieno sintetas fúngicas pero presente en TbTRI5.

De acuerdo con el árbol NJ obtenido a partir de secuencias de genes *tri5* depositadas en bases de datos, *Tbtri5* se localiza junto al gen *tri5* (número de acceso AJ784992) de *T. arundinaceum*, formando un subgrupo soportado por un valor *bootstrap* del 100%. El conjunto de secuencias se agruparon de un modo similar a las relaciones evolutivas de los diferentes grupos de organismos, quedando separados los ascomicetos y las plantas. La secuencia de *A. niger* se separó de la del resto de ascomicetos, indicando que dentro de éstos existen diferencias filogenéticas entre los genes de Hipocreales (*Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*) y Eurotiales (*Aspergillus*).

Análisis tipo *Southern* realizados en este estudio, donde se emplearon diferentes enzimas de restricción para digerir los ADNs genómicos, mostraron que en el genoma de *T. brevicompactum* IBT 40841 existe una copia única del gen *Tbtri5*, hecho que concuerda con lo descrito para diversas especies de *Fusarium* y para *T. arundinaceum* (Desjardins, y col., 1993; Gallo y col., 2004). También se detectó la presencia de un gen homólogo a *Tbtri5* en otras especies del género *Trichoderma* relacionadas con biocontrol [*T. atroviride* (T11), *T. harzianum* (T22 y T34) y *T. virens* (T59)], así como, en la cepa T52 de *T. longibrachiatum*, una especie no relacionada con el control biológico (Hermosa y col., 2004). Considerando la información disponible para especies de *Fusarium* y que en los análisis *Southern* se usaron condiciones de hibridación restrictivas, 65°C, sería lógico pensar que la ausencia de banda en los carriles que contenían el ADN de la cepa T52 digerido con *Bam*HI y de la cepa T11 digerido con *Xho*I, sea debida a una degradación del ADN, ya que se observaron bandas cuando el ADN de T52 se digirió con *Xho*I y el de T11 con *Bam*HI. De esta forma sugerimos la presencia de un gen homólogo a *Tbtri5* en todas las cepas analizadas.

Por tanto, nuestro análisis *Southern* detectó un gen homólogo a *tri5* en los genomas de *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. virens*, que fue también detectado, mediante amplificaciones por PCR, en los genomas de *T. koningii* y *T. parceramosum* (Gallo y col., 2004), especies que no han sido descritas como productoras de harzianum A o de trichodermina. En cualquier caso, *tri5* es el primer gen de la ruta y la producción de los diversos metabolitos terpénicos depende de la presencia y funcionalidad de los genes situados aguas abajo en la cascada biosintética, en la cual el gen *tri6* actúa como un regulador transcripcional de la ruta de biosíntesis de trichotecenos (Hohn y col., 1999).

En este trabajo, secuenciamos y analizamos *in silico* 367 pb de la región promotora de *Tbtri5* e inicialmente buscamos secuencias fundamentales de un promotor. No se encontró ninguna secuencia que se ajustara perfectamente a una caja TATA (5'-TATATAA-3'), aunque

se observaron dos secuencias similares (5'-TATAGAC-3' y 5'-TATACAA-3'). En este sentido, existen referencias sobre genes que se expresan eficientemente aún careciendo de dichas cajas (Alton y col., 1982). También se identificó en la región promotora la secuencia 5'-CAAGGC-3' que es un posible sitio de unión a TRI6, una proteína en dedos de zinc, requerida para la regulación de la expresión de los genes *tri* en la ruta biosintética de trichotecenos (Hohn y col., 1999). En la región promotora del gen *tri5* de *T. arundinaceum* se identificó, 500 pb aguas arriba del ATG, una secuencia de unión a TRI6, representada como 5'-YNAGGCC-3' (Gallo y col., 2004). También, se ha descrito que en la región promotora del gen *tri5* de diversos hongos productores de trichotecenos como *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. sambucinum* y *M. roridum* (Hohn y col., 1999) existen múltiples copias de los sitios de unión a TRI6, y que más de un 65% de los sitios se ajustan a la secuencia 5'-TNAGGCCT-3'. Todos los datos parecen indicar que, como ya describieran Protor y col. (1995b), en la región promotora de *tri5* hay un punto de control transcripcional en la regulación de la biosíntesis de trichotecenos que sería determinante en la producción de micotoxinas fúngicas.

Considerando otros motivos que aparecen en la región promotora de *Tbtri5* y estudios previos de regulación del gen *tri5* realizados en diferentes especies de *Fusarium*, se cultivó *T. brevicompactum* en condiciones relacionadas con estrés oxidativo y con fuentes de carbono selectivas. Ya que se trata de un gen relacionado con la producción de metabolitos secundarios, la expresión del gen se analizó tras incubarlo a diferentes tiempos relativamente largos, 1, 3 ó 7 días, observándose los mayores niveles de transcrito en cultivos de *T. brevicompactum* incubados durante 3 días. Del conjunto de condiciones ensayadas, se observó una mayor expresión de *Tbtri5* tras cultivar el hongo en presencia de glucosa al 2%, glicerol al 0,025 ó 0,1% y con 0,2 ó 0,5 mM de H₂O₂. El perfil de expresión del gen fue idéntico para todas estas condiciones: la mayor expresión tuvo lugar al tercer día de incubación y decreció al séptimo. Estos resultados parecen indicar que existe una regulación de la expresión del gen *Tbtri5* por sustrato (Covarelli y col., 2004) y por estrés oxidativo (Jiao y col., 2008).

También se identificó en la región promotora del gen *Tbtri5* un posible sitio de unión para el factor de transcripción STRE, un regulador de respuesta a estreses osmóticos, térmicos y oxidativos (Yoshikawa y col., 2008). Como se observó en *F. graminearum* (Ponts y col., 2007), la presencia de H₂O₂ en el medio de cultivo incrementaba la expresión de *Tbtri5*. También se observó que los niveles del transcrito aumentaban al añadir glicerol al 0,1% como única fuente de carbono al medio de cultivo. Se utilizan las altas concentraciones de glicerol para reducir la actividad agua (*a_w*) en el medio. Schmidt-Heydt y col. (2008) añadieron diferentes cantidades de glicerol al medio de cultivo para explorar el efecto que tenía la *a_w* en la expresión de *tri5* en *Fusarium culmorum* y detectaron la máxima expresión cuando añadían un 13% de glicerol al medio, equivalente a una *a_w* de 0,98. Sin embargo, nosotros utilizamos tres proporciones de glicerol diferentes, 0,025, 0,1 y 1%, para estudiar como afectaba este compuesto a la expresión

de *Tbtri5* y, aunque no se midieron los valores de a_w en el medio, los mayores niveles de expresión se detectaron en presencia de glicerol al 0,1%.

Estudios realizados en *F. graminearum* mostraron que la sacarosa activaba la expresión de genes *tri* e inducía la biosíntesis de trichotecenos macrocíclicos, no observando represión catabólica por carbono; sin embargo, la expresión de *tri5* no aumentaba en presencia de glucosa (Jiao y col., 2008). En este sentido, la expresión del gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* se incrementó en medios de cultivo que contenían glucosa pero no en aquellos con un 1 ó 2% de sacarosa, resultados que demuestran una regulación diferente en los genes *tri5* de ambos hongos.

Los trichotecenos son sintetizados a partir de trichodieno mediante una serie de oxigenaciones (Dejardins y col., 1993), por tanto, cambios en los parámetros oxidativos del medio de cultivo pueden interferir en el metabolismo secundario de los hongos y modular los niveles de producción de trichotecenos (Ponts y col., 2006). En experimentos realizados con *F. graminearum* se ha demostrado que al suplementar el medio con H_2O_2 se incrementa la producción de DON/ADON (Ponts y col., 2006, 2007). También, recientes experimentos realizados en *F. culmorum* han demostrado que metabolitos con propiedades antioxidantes inhiben la ruta biosintética de los trichotecenos (Boutigny y col., 2009). Nosotros utilizamos dos antioxidantes, ácido ferúlico y tirosol, que se añadieron en distintas cantidades (0,25, 1 y 5 mM) a medios que se incubaron durante 1, 3 ó 7 días, y observamos una represión de *Tbtri5* a lo largo del tiempo, al incrementar la cantidad de antioxidante. Estos resultados confirman que los antioxidantes modulan la ruta biosintética de trichotecenos en *Trichoderma*.

Se ha descrito en *Fusarium* que la regulación de la biosíntesis de trichotecenos ésta modulada por factores ambientales como temperatura y cambios de pH (Schmidt-Heydt y col., 2008). En el promotor de *Tbtri5* se localizó la secuencia 5'-GCCARG-3', que es reconocida por el factor de transcripción *PacC*, implicado en la regulación por pH (Tilburn y col., 1995) en hongos como *A. nidulans* (de Vries y Visser, 2001) o *F. oxysporum* (Caracuel y col., 2003). En nuestro estudio se analizó la expresión de *Tbtri5* a pH 4 y 8, y no se detectó expresión de este gen, posiblemente porque se trabajó con un medio mínimo insuficiente para permitir su transcripción.

La presencia de los motivos de regulación señalados en la región promotora del gen *Tbtri5* junto con los resultados obtenidos en los estudios de expresión apoyarían la hipótesis de que la regulación de este gen estaría determinada por una compleja red de señales que se activarán dependiendo de las condiciones de crecimiento del hongo (Proctor y col., 1995b; Rynkiewicz y col., 2001; Ponts y col., 2007; Jiao y col., 2008; Schmidt-Heydt y col., 2008). Así, se sugiere que la expresión óptima de genes *tri5*, que catalizan el primer paso de biosíntesis de trichotecenos, ocurre cerca de las condiciones de crecimiento óptimo del hongo, estando

regulada por estreses ambientales y nutricionales, y además es género y especie dependiente (Schmidt-Heydt y col., 2008).

Para investigar la función de *Tbtri5* en *T. brevicompactum* se utilizó una sobreexpresión homóloga, por medio de la bacteria *A. tumefaciens* AGL1, previamente transformada con el plásmido pURSPT5, para infectar la cepa IBT 40841. Se ha descrito que este método tiene una eficiencia de transformación 100 a 1000 veces superior a la de los métodos tradicionales (de Groot y col., 1998; Cardoza y col., 2006a). Aunque la forma más adecuada de asignar función a un gen pasa por la disrupción génica, en *Trichoderma*, la frecuencia de recombinación homóloga es muy baja y además varía según la cepa (Mach y Zeilinger, 1998). Hasta el día de hoy, sólo existen referencias de interrupción génica en las especies *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* y *T. reesei*. En todos los casos se utilizó una extensa región de ADN genómico (más allá de la zona codificante por ambos extremos) para favorecer la recombinación homóloga del *cassette* de interrupción en el *locus* de destino (Rosado y col., 2007; Rubio y col., 2009). Por todo ello, optamos, para asignar función a *Tbtri5* mediante la obtención de cepas transformantes de *T. brevicompactum* con copias adicionales de este gen.

En este trabajo se obtuvieron 45 transformantes que mostraron resistencia a higromicina. Tras analizar la inserción del *cassette* de expresión en 10 de los transformantes mediante PCR, se realizó un ensayo de actividad frente a las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae* para seleccionar un menor número de transformantes con los que seguir trabajando. De esta forma se seleccionaron, para su posterior caracterización, las cepas Tb41tri5, que mostró mucha mayor actividad antilevadura que la cepa silvestre, y Tb38tri5 y Tb40tri5, que mostraron una actividad ligeramente superior a la observada en IBT 40841. Posteriormente, se realizó un análisis tipo *Southern* para determinar el número de copias y el modo de integración de *Tbtri5* en dichos transformantes. En los filtros se incluyeron como controles ADN de la cepa silvestre y de un transformante que contenía el *cassette* de transformación vacío, se utilizaron como sondas un fragmento del gen *Tbtri5* y el gen *hph*, y los ADNs de las cepas se digirieron con las enzimas *Bam*HI o *Bgl*II. En las tres cepas transformantes se observó el mismo patrón de integración. La banda correspondiente al gen endógeno se detectó en las cinco cepas pero una segunda banda de 3937 pb, correspondiente al *cassette* de transformación, se observó únicamente en los tres transformantes cuando se utilizó como sonda un fragmento de *Tbtri5*. En todos los carriles se pudieron ver varias bandas inespecíficas, debidas posiblemente a sobredigestiones de los ADNs. El perfil y la intensidad de las bandas de hibridación observadas en los filtros indicaron que en las tres cepas sobreexpresantes el *cassette* de transformación se había insertado una sola vez.

Con objeto de conocer si la copia adicional de *Tbtri5* en *T. brevicompactum* IBT 40841 producía un incremento en los niveles de expresión del gen, se realizó un análisis mediante *Real-time* PCR, en el que se incluyó la cepa silvestre IBT 40841 y los tres transformantes

seleccionados. Las cepas se cultivaron bajo varias de las condiciones en las que se había detectado expresión de *Tbtri5* en la cepa silvestre. La expresión de *Tbtri5* en los transformantes fue mayor que en la cepa IBT 40841, tanto cuando los hongos se cultivaron durante 3 días en un medio sin glucosa como cuando se añadieron al medio de cultivo glucosa al 2% o H_2O_2 a 0,2 mM, aunque las mayores diferencias se observaron en cultivos del transformante Tb41tri5 crecido en un medio con glucosa al 2% o en presencia de H_2O_2 0,2 mM. Estos resultados guardan relación con aquellos obtenidos en el estudio de actividad antilevadura, es decir, a mayor expresión de *Tbtri5*, mayor actividad antilevadura. Sin embargo, cuando los hongos se cultivaron durante 1 ó 3 días en presencia de 0,25 ó 5 mM del antioxidante tirosol, los niveles del transcrito en los tres transformantes fueron muy bajos, y sólo Tb40tri5 y Tb41tri5 mostraron pequeños incrementos en la transcripción del gen respecto a la cepa silvestre en cultivos crecidos durante 1 ó 3 días en presencia de 0,25 mM de tirosol. Estos resultados, en conjunto, también muestran que los niveles de transcrito de *Tbtri5* en diferentes transformantes no son idénticos, bajo idénticas condiciones de crecimiento. Este hecho no fue inesperado, teniendo en cuenta que *Tbtri5* se sobreexpresó utilizando el plásmido pURSPT5 bajo el control del promotor *gpdA*. Estudios previos han demostrado que el gen *gpdA* no tiene una expresión constitutiva (Montero-Barrientos y col., 2007; 2008). Igualmente, también se ha observado una falta de correlación entre el número de copias insertadas de los genes *chit33*, *hsp23*, *hsp70* y *TvDim1* y sus niveles de expresión en cepas transformantes de *Trichoderma* (Limón y col., 1999; Montero-Barrientos y col., 2007; 2008; Morán-Díez y col., 2010).

Por otro lado, en un ensayo de crecimiento de las cepas silvestre y transformantes en presencia de los antioxidantes ácido ferúlico o tirosol, se observó una mayor inhibición del crecimiento de los transformantes respecto a la cepa silvestre, en presencia de 1 ó 5 mM de ácido ferúlico pero no en presencia de 0,25, 1 ó 5 mM de tirosol. Además, observamos que al igual que ocurría en la cepa silvestre, la expresión de *Tbtri5* se inhibía cuando el tirosol estaba presente en el medio. Estos resultados indican que estos dos antioxidantes, en función de su concentración en el medio de cultivo, tienen distintos efectos sobre el crecimiento del hongo y sobre la expresión de *Tbtri5*, influyendo también en la producción de trichotecenos.

Con objeto de caracterizar la actividad antimicrobiana de los transformantes que sobreexpresan el gen *Tbtri5*, se utilizó un panel de microorganismos que incluía cinco levaduras, un hongo filamentoso y cinco bacterias, tres Gram positivas y dos Gram negativas, como diana de extractos acetónicos de *T. brevicompactum* obtenidos a partir de cultivos de dos medios, PDB y CYS80. Además de las cepas de *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, usadas en los ensayos de actividad preliminares para la selección de transformantes *Tbtri5*, se incluyeron en el estudio tres *Candida* spp. y una cepa de *A. fumigatus*, ya que tradicionalmente son causantes de la mayoría de infecciones fúngicas, particularmente en pacientes inmunodeprimidos entre los que se incluyen aquellos con SIDA (Gullo, 2009); una bacteria como *B. subtilis* que puede causar contaminación de alimentos y que se utiliza como diana modelo de bacterias Gram positivas (Champney y Burdine, 1995); *S. aureus* MRSA y *E.*

faecalis vancomicina resistente, las cuales son consideradas patógenos nosocomiales emergentes de gran importancia por su impacto en la mortalidad y la morbilidad (Lee y col., 2007; Chou y col., 2008; Sawicki y col., 2008); y, dos bacterias Gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* con gran interés en clínica porque son responsables de muchas infecciones.

En estudios previos no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de cepas de *Trichoderma* activas cuando se compararon cultivos procedentes de los medios PDB y CYS80 (Vizcaíno y col., 2005). Sin embargo, en los ensayos antimicrobianos realizados con los extractos acetónicos de *T. brevicompactum* se observó siempre una mayor actividad en extractos procedentes de medio PDB y que la sobreexpresión de *Tbtri5* producía un incremento en la actividad de *T. brevicompactum*.

Los extractos acetónicos de *T. brevicompactum* fueron activos frente a las bacterias Gram positivas pero no frente a las Gram negativas. Particularmente, los extractos de Tb41tri5 procedentes de PDB mostraron mayor actividad que los antibióticos higromicina, usado a 300 µg/mL frente a *B. subtilis*, y kanamicina, aminoglucósido que inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma y que se usa frente a *S. aureus* (Ishibashi y col., 2009), utilizada a 0,5 µg/mL como control en este ensayo. La actividad observada frente a *B. subtilis* es comparable con la descrita en estudios previos para extractos de *T. longibrachiatum* (Vicente y col., 2001). Además, en los ensayos realizados en medio líquido observamos que los extractos acetónicos de *T. brevicompactum* procedentes de cultivos en PDB tenían muy buena actividad frente a *S. aureus* fenotipo MSSA, siendo el porcentaje de inhibición semejante al producido por 0,312 µg/mL de penicilina G que se incluyó como control. También se ha descrito que los terpenos tienen capacidad de interactuar con la membrana fosfolipídica bacteriana y, a su vez, habilidad para penetrarla y alcanzar componentes intracelulares (Trombetta y col., 2005), hechos que podrían explicar la actividad observada en los extractos de *T. brevicompactum* frente a bacterias Gram positivas.

Aunque en los ensayos realizados en medio sólido no observamos actividad frente a las bacterias Gram negativas para los extractos acetónicos de *T. brevicompactum*, éstos sí mostraron actividad frente a *E. coli*, particularmente aquellos procedentes de Tb41tri5, en los ensayos realizados en medio líquido. Ambos resultados no pueden considerarse contradictorios porque en estos ensayos se utilizaron dos cepas de *E. coli* fenotípicamente diferentes, siendo MB 5746 una cepa en la que se ha descrito que posee menor sensibilidad a los antibióticos. Por otro lado, podríamos explicar que esa menor actividad observada para los extractos de *Trichoderma* frente bacterias Gram negativas sea debida a que la membrana de éstas está compuesta principalmente de lipopolisacáridos que conforman una barrera de permeabilidad hidrofílica y protegen contra antibióticos altamente hidrofóbicos. Sin embargo, convendría destacar los porcentajes de inhibición del crecimiento de *A. baumannii*, 61,5%, obtenidos con el extracto procedente del transformante Tb41tri5, ya que este patógeno se ha

convertido en los últimos años en un problema emergente de la sanidad mundial. El significado clínico de *A. baumannii* está remarcado por su habilidad para adquirir determinantes de resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, incluidos los carbapenemes (Peleg y col., 2008; Poetsch y Wolters, 2008), justificando la necesidad de nuevas terapias y, por tanto, la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos frente a este patógeno.

También se observó que los extractos de PDB de *T. brevicompactum* mostraban buena actividad frente a las tres cepas de *Candida* spp. y frente al hongo filamentoso *A. fumigatus* y, particularmente, los procedentes del transformante Tb41tri5 superaban en actividad a dos antibióticos utilizados como controles, anfotericina B a 0,25 μ g/mL e higromicina a 300 μ g/mL. También los extractos de *T. brevicompactum* mostraron una mejor actividad que extractos de *T. longibrachiatum* analizados en estudios previos frente a esos mismos patógenos (Vicente y col., 2001). Las mayores limitaciones de los antifúngicos actuales son la nefrotoxicidad (Georgopapadakou y Walsh, 1994; Ha y col., 2010) y la emergente resistencia a azoles (Panackal y col., 2006; Qiao y col., 2008), situación que justifica la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos, preferiblemente de origen natural y con nuevos mecanismos de acción. En este sentido, se ha sugerido que la actividad antifúngica observada en extractos de *Trichoderma* sería debida a interferencias en la síntesis de la pared celular y, particularmente, por una inhibición de componentes esenciales como el glucano, la quitina o las manoproteínas (Vicente y col., 2001, Vicente y col., 2003) y, también, se ha demostrado que ácidos terpénicos, como la ergokonina A aislada de *T. koningii*, *T. viride* y *T. longibrachiatum*, poseen ese mecanismo de acción (Onishi y col., 2000). La inhibición de la síntesis de proteínas se ha considerado una de las dianas más atractivas en el desarrollado de agentes antimicrobianos, pero no puede ser aplicable a las terapias antifúngicas por la similitud que existe en la maquinaria de síntesis de proteínas entre hongos y mamíferos (Vicente y col., 2003).

Investigaciones previas, realizadas principalmente con plantas y algas, han demostrado la actividad antineoplásica de compuestos terpénicos frente a diferentes líneas celulares tumorales como MCF-7 (cáncer de mama), HeLa (cáncer cervical), HT-29 (cáncer de colon), KB (cáncer de cavidad oral) (Wang y col., 2004; Cervia y col., 2007; Boonsri y col., 2008; Juan y col., 2008; Zang y col., 2008; Kawasaki y col., 2009), A-549 (carcinoma pulmonar), DLD-1 (adenocarcinoma de colon), M4BEU (melanoma) y Bel-7402 (hepatoma) (Legault y col., 2003; Sylvestre y col., 2006; Tao y col., 2006; Chinworrungsee y col., 2008; Davis y col., 2008). Sin embargo, existen muy pocos trabajos dedicados a estudiar la actividad antitumoral de terpenos aislados de hongos, únicamente se ha descrito la actividad de los trichotecenos harzianum A y B, aislados de *Trichoderma* sp., frente a líneas tumorales como HeLa (cáncer cervical), MCF-7 (cáncer de mama) y HT1080 (fibrocarcinoma) (Lee y col., 2005; Jin y col., 2007). En este sentido, el paclitaxel (taxol), un diterpeno originalmente aislado de *Taxus brevifolia*, y recientemente encontrado en hongos como *Taxomyces andreanae* y *Pestalotiopsis microspora* (Zhou y col., 2007), se usa actualmente en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón,

ovario, mama, cabeza y cuello de útero, y formas avanzadas del sarcoma de Kaposi (Newman y Cragg, 2007; Ondari y Walker, 2008).

Al evaluar y comparar la capacidad antitumoral de los extractos acetónicos de cepas de *T. brevicompactum* que sobreexpresan el gen *Tbtri5* frente a diferentes líneas celulares, se observó que la sobreexpresión incrementaba la actividad antitumoral. Además, se observó especificidad frente a las líneas tumorales de mama (MCF-7), ovario no resistente a doxorubicina (MES-SA) y ovario resistente a doxorubicina (MES-SA/Dx5). Este es un dato interesante, ya que el cáncer de mama y ovario son dos de las neoplasias más comunes en el mundo. También se ha descrito que en los tratamientos con antraciclinas, como la doxorubicina, se produce mielosupresión, cardiotoxicidad y emergencia de resistencia (Lu y Waxman, 2005). Así, se hace necesaria la investigación y desarrollo de nuevos agentes contra líneas celulares tumorales, preferiblemente, con mecanismos de acción novedosos.

Por otro lado, aunque los extractos acetónicos de *T. brevicompactum* mostraron actividad frente a líneas celulares no tumorales (184-A1 y CCD-16Lu), este efecto fue reversible. Mientras que la actividad observada frente a líneas tumorales humanas no lo fue. Interesantemente, el extracto de Tb41tri5 afectó a todas las líneas tumorales más eficazmente que el resto de los extractos estudiados. Además, este extracto no mostró actividad frente a fibroblastos de pulmón sano (línea CCD-16Lu). Investigaciones previas han demostrado que los compuestos terpénicos causan cambios morfológicos como retracción, redondeo y disminución de las células cultivadas, ocurriendo un reordenamiento de los filamentos de actina y de los microfilamentos intermediarios (Martín y col., 2009). Además, las células en presencia de estos compuestos muestran una reducción significativa en su capacidad para adherirse y difundir. De los resultados de actividad antitumoral obtenidos con los extractos de *T. brevicompactum* se desprende, por un lado, la existencia de selectividad ya que se observaron diferencias entre las líneas tumorales y las normales; y, por otro lado, su capacidad para impedir el crecimiento celular.

Las diferencias de actividad microbiana entre la cepa silvestre y los transformantes, particularmente con Tb41tri5, la cepa que mostró los mayores niveles del transcrito *Tbtri5*, relacionaban TbTRI5 con la actividad antimicrobiana de *T. brevicompactum*. Para confirmar la participación de TbTRI5 en la biosíntesis de trichotecenos, analizamos la producción de metabolitos en la cepa silvestre y en el transformante Tb41tri5. Los estudios de cromatografía demostraron que el transformante Tb41tri5 producía mayores cantidades de tirosol y trichodermina, y menores cantidades de hidroxitirosol que la cepa silvestre, bajo idénticas condiciones de crecimiento. Ya que sólo la trichodermina mostró actividad antimicrobiana frente a levaduras y las bacterias multirresistentes de origen nosocomial que se utilizaron como dianas en los ensayos, este metabolito parece ser responsable del incremento de actividad antimicrobiana que se observa tras la sobreexpresión del gen *Tbtri5*. Estos datos confirman

que *Tbtri5* está implicado en la producción de trichodermina en *T. brevicompactum*, y están de acuerdo con la posición taxonómica y con el metaboloma de esta especie (Degenkolb y col., 2008a).

Además, como era esperable, la trichodermina purificada a partir de las fracciones activas de los sobrenadantes de cultivo de *T. brevicompactum*, mostró mayor inhibición frente a las bacterias Gram positivas que los extractos acetónicos, mostrando además actividad frente a *P. aeruginosa*, frente a la cual no se había observado actividad con los extractos acetónicos. En este sentido, la actividad mostrada frente a *P. aeruginosa* multirresistente fue superior a la descrita para el lignoreno, un metabolito derivado sesquiterpénico que fue aislado de *T. viride*, frente a *P. aeruginosa* K 599/WT, una cepa sensible a antibióticos β -lactámicos y que es utilizada para estudiar la implicación de las barreras de penetración celular en la resistencia a penicilinas y cefalosporinas (Berg y col., 2004). El lignoreno presenta actividad frente a *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *S. salmonicolor* y *R. rubra*, pero no es activo frente a *C. albicans*, *Penicillium notatum* y *F. culmorum* (Berg y col., 2004). Sin embargo, la trichodermina sí demostró ser activa frente a las tres levaduras y el hongo filamentoso incluidos en nuestros ensayos.

La trichodermina es un metabolito con 17 átomos de carbono, su fórmula química es 4 β -acetoxi-12,13-epoxitrichotec-9-eno; siendo el puente 12,13-epoxi el que parece conferir a esta molécula, tóxica para eucariotas, una potente actividad antibiótica y antineoplásica y, por tanto, un potencial interés clínico (Chen y col., 2008). La multirresistencia microbiana a antibióticos es un problema que demanda un mayor esfuerzo en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. Los resultados obtenidos en los ensayos frente a bacterias y hongos multirresistentes con la trichodermina producida por *T. brevicompactum* son esperanzadores de cara al uso de este antibiótico, ya que en algunos casos es más potente, a idéntica concentración, que antibióticos comerciales como anfotericina B, higromicina y amikacina.

El tirosol [4-(2-hidroxietil) fenol] es un metabolito fenólico antioxidante presente en aceite de oliva o vino (Tarus y col., 2003), pero también producido por levaduras y hongos filamentosos, que recientemente se ha identificado en cultivos de *T. viride* (Daoubi y col., 2009). Es sintetizado a partir de una reacción de transaminación entre la L-tirosina y el 2-oxoglutarato, dando p-hidroxifenil-acetaldehído y ácido L-glutámico. El producto formado es entonces descarboxilado, y el aldehído resultante es reducido a tirosol (Sentheshanmuganayhan y Elsdén, 1958; Covas y col., 2003; Ahn y col., 2008). Estudios previos han mostrando que derivados del tirosol poseen actividades biológicas entre las que destacan su capacidad antibiótica, antioxidante y citotóxica en animales y plantas (Liebgott y col., 2008). Además, se ha demostrado que el tirosol es una molécula señalizadora del *quorum-sensing*, o comportamiento coordinado de una población microbiana frente a un estímulo, en levaduras como *C. albicans* y en bacterias de importancia clínica como *P.*

aeruginosa o *Burkholderia cepacia* (Chen y col., 2004; Alem y col., 2006). Se ha observado que el tirosol acorta la fase de latencia en cultivos de *C. albicans* y estimula la formación de tubos germinativos en células levaduriformes así como el desarrollo y ramificación de las hifas durante las primeras etapas de la formación de biopelículas (Chen y col., 2004; Alem y col., 2006; de Sordi y Mühlischlegel, 2009). Cuando incluimos en los ensayos de actividad antimicrobiana tirosol purificado a partir de los cultivos de *T. brevicompactum*, no se observó actividad antimicrobiana frente a ninguno de los microorganismos ensayados. Este resultado está de acuerdo con observaciones realizadas en estudios previos donde extracto fenólico de vino con alto contenido en tirosol no inhibían el crecimiento de *C. albicans* (Papadopoulou y col., 2005). Además, tampoco observamos inhibición del crecimiento de la cepa silvestre y de los transformantes *Tbtri5* cuando se cultivaron en medios que contenían una concentración de tirosol de hasta 5 mM.

El hidroxitirosol [2-(3',4'-dihidroxifenil) etanol] es un compuesto fenólico natural, derivado lipofílico del tirosol, y con propiedades antioxidantes atribuibles a su fracción orto-difenólica (Sentheshanmuganayhan y Elsdén, 1958; Bernini y col., 2008). Se ha descrito que el hidroxitirosol brinda protección a los eritrocitos humanos frente a daños oxidativos, induce la apoptosis dependiente de citocromo c y previene enfermedades cardiovasculares y agregación plaquetaria, y ciertos tipos de cáncer. El hidroxitirosol se utiliza para tratar procesos inflamatorios y como protector frente a enfermedades neurodegenerativas. Además, tiene aplicación cosmética para el cuidado de la piel (Ragione y col., 2000; Gutiérrez y col., 2001; Covas y col., 2003; Fabini y col., 2008).

Una vez observada la existencia de actividad antitumoral en los extractos acetónicos de *T. brevicompactum*, y dado que se había descrito que la trichodermina posee la capacidad de inhibición de síntesis de proteínas en células de mamíferos (Wei y col., 1974; Carter y col., 1976), se realizaron ensayos con trichodermina y tirosol, purificados a partir de sobrenadantes de cultivo del hongo, para determinar la DE50 de ambos metabolitos frente a tres líneas celulares tumorales. Dos de ellas (A-549 y Hep-G2) fueron, en general, más resistentes al tratamiento con los extractos acetónicos y la tercera (MCF-7) fue más sensible a dichos tratamientos. Además se incluyó otra línea de hepatocarcinoma (Hep-3B), que no se utilizó en los ensayos con extractos acetónicos. Para las cuatro líneas celulares el tirosol no mostró actividad antitumoral, pero éstas fueron sensibles a la trichodermina, siendo mayor la actividad antitumoral sobre la línea MCF-7, seguida de las líneas A-549 y Hep-3B y, finalmente, Hep-G2. En el caso del tratamiento con el extracto acetónico proveniente del transformante *Tb41tri5*, se había observado una mayor resistencia sobre la línea A-549 y una sensibilidad parecida para las líneas MCF-7 y Hep-G2. Por otro lado, comparando los resultados de la DE50 de la trichodermina respecto a la del taxol observamos una menor actividad antitumoral de la trichodermina. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el taxol es un agente comercial purificado y estabilizado, y que la fracción de trichodermina utilizada en este estudio sólo se

había purificado por HPLC. Por otro lado, la diferencia de actividad citotóxica entre la trichodermina y el taxol se puede deber también a su diferente composición química, implicando características electrónicas, lipofílicas y de geometría molecular.

Con trichodermina y con taxol la citotoxicidad frente a hepatocitos humanos sanos fue dependiente de la dosis. La estabilización de la DE50 de la trichodermina sobre la línea de hepatocitos humanos sanos no se observó hasta después de 38 h de iniciar del tratamiento, indicando que posiblemente la trichodermina necesite ese tiempo para ingresar en la célula y poder actuar. Comparados estos resultados con los observados para el taxol, la trichodermina tiene una acción citotóxica más lenta. Este retraso podría ser causado por un ataque nucleofílico que la trichodermina sufriría en su centro activo (NH_2 , OH^- o COO^-), resultando en un enlace covalente permanente (no reversible). La trichodermina, por tanto, necesitaría tiempo para translocarse y poder llegar a su diana molecular para formar ese enlace covalente. En otras palabras, dependiendo del medio en que se encuentre la trichodermina, ésta podría transformarse en un diol, que sería el compuesto activo responsable de la actividad biológica. A pesar de que la trichodermina presentó un menor efecto antitumoral, también se observó una menor citotoxicidad frente a la línea de hepatocitos sanos, en comparación con el taxol. Por tanto, podemos proponer que estudios más exhaustivos a nivel bioquímico de la molécula de trichodermina podrían conducir a una mejora en su actividad.

A diferencia del taxol, cuya DE50 se estabiliza a las 24 h y su citotoxicidad va acompañada de una proliferación de las células remanentes, nuestros resultados muestran que la trichodermina es menos citotóxica frente a células sanas y además tiene un efecto citostático frente a cultivos de células tumorales, que se mantiene en el tiempo al menos durante las primeras 72 h del ensayo. Este comportamiento hace de la trichodermina una molécula muy interesante en la investigación de tratamientos oncológicos, especialmente en metástasis.

La literatura describe que la trichodermina afecta a la síntesis de proteínas, mediante la inhibición directa de la actividad peptidil transferasa en los ribosomas eucarióticos (Tscherne y Pestka, 1975). Se sugiere que el efecto inhibitor de la trichodermina es relativamente específico: a nivel de la terminación de la elongación de la cadena peptídica (Tate y Caskey, 1973; Wei y col., 1974; Fernández-Lobato y col., 1990). Además, la trichodermina no parece causar ruptura y/o disgregación de los polirribosomas eucarióticos, debido a que esta molécula se uniría al ribosoma de manera covalente, a través de la apertura del anillo epóxido (Cundliffe y col., 1974).

Además de las actividades antimicrobianas y antitumorales observadas en *T. brevicompactum* IBT 40841 y la relación del gen *Tbtri5* con las mismas, también se estudió la capacidad potencial de esta cepa de *Trichoderma* como agente de control biológico. Aunque las principales especies de *Trichoderma* spp. con eficacia en el biocontrol de fitopatógenos se

clasifican como *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* o *T. atroviride* (Hermosa y col., 2004), las propiedades antibiótica y citotóxica de *T. brevicompactum* podrían aconsejar su uso en estrategias de control biológico en agricultura. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de cultivos duales en los que se incluyeron los fitopatógenos *B. cinerea*, *R. solani* y *P. irregulare* mostraron que *T. brevicompactum* no posee capacidad micoparasítica y que la sobreexpresión de *Tbtri5* no afecta esa capacidad. Se ha descrito que la acción micoparasítica directa de *Trichoderma* combina la secreción de enzimas hidrolíticas y la formación de estructuras de infección en el hospedador, cuya penetración se ve facilitada por metabolitos secundarios, algunos de los cuales se ha demostrado que actúan de forma sinérgica con dichas enzimas hidrolíticas (Schirmböck y col., 1994; Hanson, 2005). En esta tesis no se ha analizado la capacidad de *T. brevicompactum* para producir enzimas hidrolíticas de la pared celular de fitopatógenos, pero parece que la mera producción de trichotecenos no sería un motivo suficiente para controlar los fitopatógenos ensayados, probablemente porque a diferencia de los hongos patógenos humanos utilizados en los ensayos de antibiosis, los fitopatógenos que viven en el suelo presentarían una mayor resistencia a los metabolitos secundarios de *T. brevicompactum*.

Muchas especies de *Trichoderma* mantienen una relación con las plantas como simbioses avirulentos (Harman y col., 2004), proporcionándoles beneficios que van desde un mejor desarrollo de raíces hasta un incremento en la producción de los cultivos y una estimulación de sus defensas (Harman, 2006). Metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma*, tienen un efecto estimulante sobre el desarrollo de la planta cuando se aplican a dosis bajas (Vinale y col., 2008). Sin embargo, está descrito que los trichotecenos de *Fusarium* spp. son fitotóxicos y que actúan como factores de virulencia en plantas hospedadoras sensibles (Proctor y col., 1995a). Además, se sabe que trichotecenos como harzianum A y trichodermina característicos del *clade* BREVICOMPACTUM son fuertes inhibidores de la germinación de semillas y no promueven el crecimiento de las plantas por ser sustancias fitotóxicas (Cutler y LeFiles, 1978; Nielsen y col., 2005; Degenkolb y col., 2008a).

Los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo* con semillas y plantas de tomate para conocer su respuesta a *T. brevicompactum* y a la sobreexpresión de *Tbtri5*, mostraron que la emergencia y el tamaño de las plantas era menor en presencia de *T. brevicompactum* y menor aún con los transformantes Tb40tri5 y Tb41tri5. Además las lesiones necróticas producidas por *B. cinerea* en plantas de tomate cuyas semillas habían sido tratadas previamente con las distintas cepas de *T. brevicompactum*, se vieron incrementadas por estos tratamientos. En cualquier caso, la producción de trichodermina y los efectos fitotóxicos observados sobre tomate, parecidos a los descritos para trichotecenos de *Fusarium* spp., invalidan la utilización de *T. brevicompactum* IBT 40841 como agente de biocontrol en agricultura.

Debido al elevado interés fitopatológico de la toxina T2 de *Fusarium* spp., especialmente por los daños económicos que causa, son varios los estudios orientados al conocimiento de la

organización génica de la ruta biosintética de trichotecenos en este género (Hohn y Desjardins, 1992; Brown y col., 2004; Kimura y col., 2007). Se ha descrito que la mayoría de genes *tri* de *Fusarium* se agrupan en un *cluster* altamente conservado entre especies pero que difiere en el tamaño y la presencia/ausencia de algunas genes como sucede en *F. graminearum* y *F. sporotrichoides* (Brown y col., 2004). De forma similar, nuestro grupo de investigación ha obtenido la secuencia completa del *cluster* de genes *tri* en *T. arundinaceum* IBT 40837, y observado que su composición y organización es diferente a la descrita en *Fusarium* spp. y que, particularmente, el gen *tri5* se localiza fuera del *cluster* de genes *tri* (S. Gutiérrez, comunicación personal).

Con el objeto de determinar si los genes *tri* de *T. brevicompactum* IBT 40841 también se localizaban dentro de un *cluster* y, de ser así, cuál era su organización, se realizaron diferentes reacciones de PCR con una serie de oligonucleóticos, diseñados estratégicamente sobre la secuencia del *cluster* de *T. arundinaceum* IBT 40837. Los resultados demuestran que la disposición de los genes *tri* en el *cluster* de *T. brevicompactum* es idéntica que la de *T. arundinaceum*. Además, la mayoría de los genes y regiones espaciadoras entre los mismos, se encuentran muy conservadas entre ambas especies. No obstante, se observó polimorfismo en el gen *tri4* y en las regiones espaciadoras entre los genes *tri12-tri11* y *tri4-tri6*. Este polimorfismo no es raro si se tiene en cuenta el ya descrito en especies de *Fusarium*. Se ha propuesto que el polimorfismo en genes *tri* se mantiene para lograr un equilibrio de selección entre especies productoras de diferentes quimiotipos de trichotecenos (Ward y col., 2002), lo cual concuerda con nuestros resultados, ya que dentro del grupo BREVICOMPACTUM, *T. arundinaceum* produce harzianum A (Gallo y col., 2004) y *T. brevicompactum* produce trichodermina (Degenkolb y col., 2008a).

Interesantemente, nuestros resultados muestran que en *T. brevicompactum* los genes *tri6* y *tri10* no flanquean al gen *tri5*, como se ha descrito en *F. sambucinum*, *F. sporotrichoides* y *F. graminearum* (Brown y col., 2001; Peplow y col., 2003a). Desconocemos por qué *Tbtri5* se encuentra fuera del *cluster tri* aunque parece ser una característica de *Trichoderma* ya que sucede también en *T. arundinaceum*. El *cluster tri* de *T. brevicompactum* contiene 7 genes por los 10 y 12 de *F. graminearum* y *F. sporotrichoides*, respectivamente, pero no parece que todos ellos estén implicados en la biosíntesis de trichodermina. En la Figura 51 se representa la ruta biosintética de la trichodermina a partir de los resultados previamente publicados en *Fusarium* spp. (Desjardins y col., 1993; Kimura y col., 2003; 2007; Tokai y col., 2007; Degenkolb y col., 2008a). La biosíntesis de trichodermina a partir de FPP implica la participación de los genes *Tbtri5* para producir trichodieno y *tri4* para convertirlo en isotrichodiol que, a través de un compuesto intermediario, producirá trichodiol y trichodermol, precursor éste de la trichodermina y del harzianum A; junto a los reguladores transcripcionales *tri6* y *tri10*. Como *T. brevicompactum* no produce otro tipo de trichotecenos (Degenkolb y col., 2008a), tampoco se conoce la función del resto de genes *tri* en esta especie.

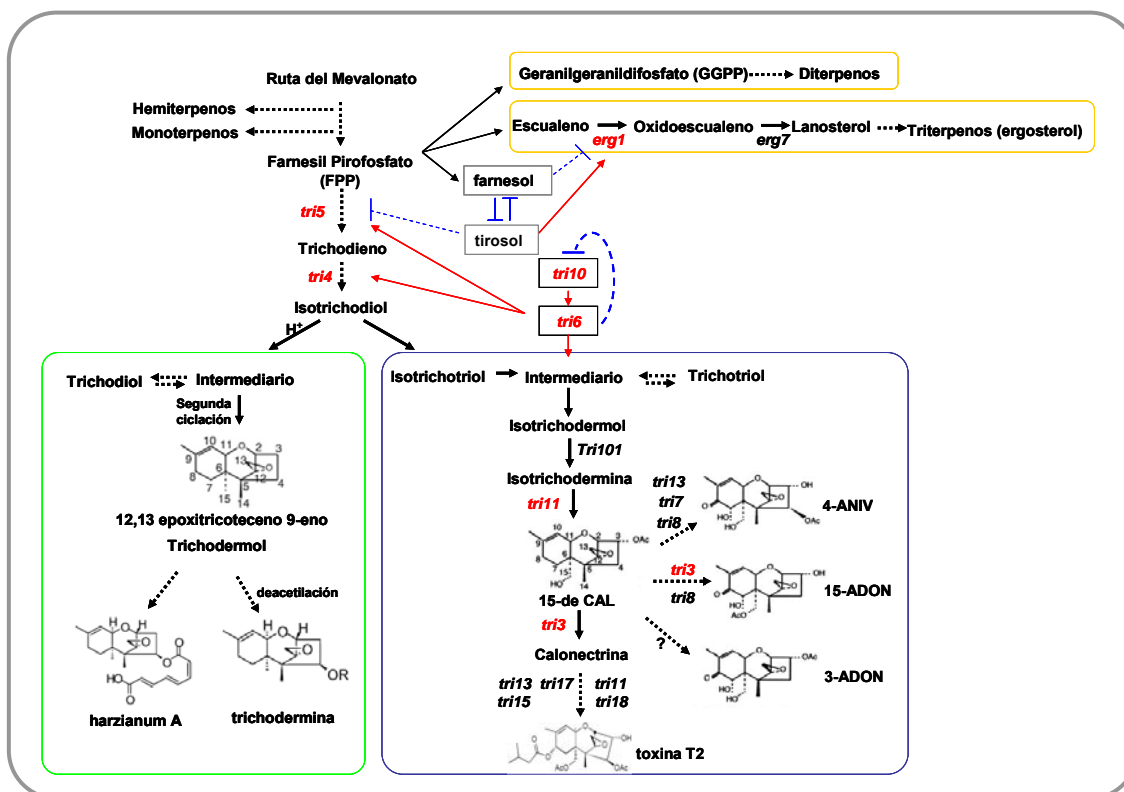


Figura 51. Modelo de regulación de la ruta biosintética de la trichodermina y otros terpenos. La síntesis de compuestos diterpenos y triterpenos se encuentra en recuadros amarillos, la síntesis de harzianum A y trichodermina en un recuadro verde y la de de trichotecenos de *Fusarium* spp. en un recuadro azul. Los genes indicados en rojo corresponden a los incluidos en esta tesis doctoral. Los genes en recuadro negro (*tri6* y *tri10*) corresponden a genes reguladores de la ruta. El farnesol y el tiroso son moléculas antagonistas y reguladoras de la ruta. Las flechas rojas indican regulación positiva, la línea discontinua azul indica una posible actividad inhibitoria. Las flechas negras discontinuas indican pasos intermedios en la ruta biosintética y las líneas negras continuas pasos sucesivos en la biosíntesis. Modificado de Desjardins y col., 1993; Kimura y col., 2003 y 2007; Tokai y col., 2007; Degenkolb y col., 2008a; de Sordi y col., 2009; Kruppa, 2009.

Dentro del *cluster tri*, los genes *tri4*, *tri5* y *tri6* son considerados genes tempranos de la ruta de biosíntesis de trichotecenos y, en especies de *Fusarium*, se ha descrito que probablemente su bajo nivel de expresión puede estar relacionado con su participación en vías compartidas (Peplow y col., 2003a). Los genes *tri3*, *tri11*, *tri12* y *tri14*, que parecen ser innecesarios en la ruta biosintética de trichodermina, son genes tardíos de la producción de trichotecenos en *Fusarium* spp., y se conoce que *tri11* y *tri12* se encuentran bajo el control de *tri10* pero no de *tri6*, mientras que *tri3* está regulado por ambos (Peplow y col., 2003a).

En general, cuando se cultivó *T. brevicompactum* IBT 40841 en condiciones donde se había observado una alta expresión de *Tbtri5*, se comprobó que los genes del *cluster tri* apenas incrementaban su expresión. Sin embargo, los perfiles de expresión no fueron homogéneos en los tres transformantes ya que mientras en la cepa Tb38tri5 fueron similares a los observados en la cepa silvestre, en el transformante Tb40tri5 se detectó una ligera mayor expresión de *tri4* pero mucha mayor expresión de *tri10*, y en el transformante Tb41tri5 todos los genes excepto

tri14 incrementaron su expresión, particularmente *tri10*. Precisamente ha sido en el gen regulador *tri10* donde se han visto las mayores diferencias de expresión entre la cepa silvestre y los dos transformantes con mayor actividad biológica. Estos resultados concuerdan con estudios publicados para especies de *Fusarium*, donde el nivel de expresión de *tri6* fue bajo y se mantuvo prácticamente constante durante todo el curso de incubación (Ponts y col., 2007). Por otro lado, al tratarse de genes reguladores (Jiao y col., 2008), *tri6* y *tri10* deberían expresarse a tiempos más cortos que los genes *tri4* y *tri5*.

Existe un modelo de regulación en *loop* para *Fusarium* spp., en el que se propone que *tri10* presumiblemente activado por algún factor desconocido, regularía positivamente a *tri6*. Sin embargo, *tri10* no es regulado positivamente por *tri6*, pero *tri6*, sólo o asociado a otro factor, bloquearía la expresión de *tri10* (Honh y col., 1999; Tag y col., 2001). También se conoce que *tri6* y *tri10* no son los únicos factores de control de la expresión de *tri4* y *tri5*, ya que se ha descrito que *tri15* es un regulador negativo de la biosíntesis de trichotecenos en *F. sporotrichioides* y *F. graminearum* (Alexander y col., 2004). Además, se ha observado que la disrupción de *tri10* no inhibe completamente la expresión de los genes *tri4*, *tri5* o *tri6*, y que tras la disrupción de *tri6*, aún causando una severa reducción de la expresión de genes *tri*, los niveles basales que se siguen detectando para estos genes sólo se justificarían con la existencia de otros reguladores (Tag y col., 2001).

Se ha descrito en *Fusarium* que *tri12* actúa como un gen autoprotector frente a sus propios trichotecenos (Alexander y col., 1999) y la localización de este gen en el cluster *tri* de *T. brevicompactum* podría justificar la resistencia de la cepa silvestre y los transformantes a la trichodermina. Sin embargo, a la vista de los resultados de expresión observados en las cepas de *T. brevicompactum*, no parece que se necesiten altos niveles de transcrito de este gen, y no debería descartarse que existieran otros mecanismos de autoprotección como el gen *tri101* descrito en *Fusarium* (McCormick y col., 1999).

Por otro lado, la represión por tirosol observada para *Tbtri5* también se detectó para los genes *tri4*, *tri6* y *tri10* cuando *T. brevicompactum* se cultivó durante 1 ó 3 días con tirosol 0,25 ó 5 mM. El gen *tri4* codifica una P450 monooxigenasa, implicada en el paso de trichodieno a isotrichodiol sintasa, y junto con la trichodieno sintasa codificada por *Tbtri5* son consideradas las mejores dianas para interrumpir la producción de trichotecenos (McCormick y col., 2006; Tokai y col., 2007).

Como se mencionó anteriormente, nuestros resultados mostraban que el tirosol reprimía la expresión de *Tbtri5* y también la de tres genes del cluster *tri* que habíamos analizado, lo que conduciría a una disminución en la producción de trichotecenos. Además se trababa de una represión duradera pues en el caso de *Tbtri5*, del que se investigaron sus niveles de expresión en distintos cultivos durante una semana, se mantenía el séptimo día. Por

otro lado, los resultados del análisis cromatográfico de la cepa silvestre y el transformante Tb41tri5 mostraron que la sobreexpresión de *Tbtri5* daba como resultado un incremento de la producción de trichodermina, aunque curiosamente venía acompañado de una mayor producción de tirosol. Precisamente el tirosol es una molécula antagonista del farnesol, un derivado de FPP que está implicado en la regulación del *quorum sensing* en *C. albicans* (Kruppa, 2009) y que inhibe la filamentación y la formación de biopelículas en esta levadura (De Sordi y Mühlischlegel, 2009). El hecho de que el tirosol se produzca a la vez que se incrementan los niveles de trichodermina podría explicarse como un intento por parte de la célula de regular los niveles de la pareja antagónica farnesol:tirosol, puesto que trichodermina y farnesol tienen FPP como precursor común. No está descrito que el tirosol forme parte, o intervenga de alguna forma, en la ruta biosintética de trichotecenos en *Fusarium* spp., por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la ruta biosintética de sesquiterpenos es compleja y con ella interaccionarían otros sistemas reguladores del catabolismo de FPP.

Como sabíamos que el FPP es un intermediario común en la ruta biosintética de diterpenos, triterpenos y sesquiterpenos en *Trichoderma* (Cardoza y col., 2006b y 2007), analizamos la expresión de un gen supuestamente competidor del *Tbtri5* como es el *erg1*, que codifica la escualeno epoxidasa, una enzima implicada en la biosíntesis de triterpenos como el ergosterol. Curiosamente, la represión de *Tbtri5* que se observaba en todas las cepas, silvestre y transformantes, cuando se añadía tirosol al medio de cultivo estuvo acompañada por un marcado incremento de la expresión de *erg1* únicamente en cultivos de 24 h del transformante Tb41tri5 con tirosol al 0,25 mM, a pesar de que un incremento en la expresión de ese gen se había observado en los transformantes Tb40tri5 y Tb41tri5 cultivados en un medio que contenía glucosa al 2%. Estos resultados muestran que el perfil de expresión de *erg1* en presencia de tirosol es diferente en ambos transformantes. Se necesitan más estudios que nos ayuden a comprender el origen del tirosol y su función en la ruta biosintética de trichodermina en *T. brevicompactum*, a la vez, que entender las interacciones entre las diferentes rutas biosintéticas de los distintos terpenos (diterpenos, triterpenos y sesquiterpenos) que tienen en FPP un intermediario común.

CONCLUSIONES

1. El gen *Tbtri5*, que codifica una trichodieno sintasa, se encuentra como copia única en el genoma de *T. brevicompactum* IBT 40841, y existe un gen homólogo en cepas pertenecientes a otras especies de *Trichoderma*. Además, la proteína TbTRI5 posee las tres regiones conservadas relativas al centro catalítico de las terpeno ciclasas, y tiene una identidad aminoacídica de un 99% con una hipotética trichodieno sintasa de *T. arundinaceum* y de un 60% con trichodieno sintasas de *Fusarium* spp.
2. Los datos obtenidos en los estudios de expresión de *Tbtri5* revelan que el gen está regulado a nivel transcripcional por factores nutricionales y condiciones de estrés. Así, al igual que se ha observado para genes *tri5* en *Fusarium* spp., el glicerol y el H₂O₂ inducen su expresión mientras que compuestos antioxidantes como el ácido ferúlico y el tirosol la reprimen. Sin embargo, contrariamente a lo observado en *Fusarium* spp., *Tbtri5* se induce por glucosa y no por sacarosa.
3. La presencia en los transformantes *Tbtri5* de la cepa IBT 40841 de una copia adicional del gen *Tbtri5*, junto a unos mayores niveles de expresión del mismo, demuestra que éstos sobreexpresan *Tbtri5*.
4. La detección de mayores actividades, antifúngica y antitumoral, en extractos de cultivos de los transformantes que sobreexpresan *Tbtri5*, relacionan el gen *Tbtri5* de *T. brevicompactum* con estas capacidades.
5. Los resultados de los análisis cromatográficos y espectroscópicos muestran que la sobreexpresión del gen *Tbtri5* incrementa la producción de trichodermina y tirosol, y relacionan a *Tbtri5* con la producción de estos metabolitos.
6. Los halos de inhibición producidos por la trichodermina pero no por el tirosol en los ensayos antimicrobianos, frente a un panel de microorganismos que incluía tres levaduras (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*), un hongo filamentoso (*A. fumigatus*) y cuatro bacterias nosocomiales (*P. aeruginosa*, *S. aureus* MRSA, *E. faecalis* vancomicina resistente y *A. baumannii*), en la mayoría de los casos superiores a los producidos por antibióticos comerciales como anfotericina B, kanamicina e higromicina, demuestran que entre los metabolitos producidos en mayor cantidad por los transformantes *Tbtri5* es la trichodermina la molécula responsable de la mayor actividad antimicrobiana de dichos transformantes.
7. La inhibición celular producida por la trichodermina pero no por el tirosol frente a las líneas: adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de pulmón (A-549) y carcinoma hepatocelular (Hep-3B y Hep-G2), y en menor grado frente a la línea de hepatocitos

humanos sanos, demuestra que entre los metabolitos producidos en mayor cantidad por los transformantes *Tbtri5* únicamente la trichodermina posee actividad antitumoral.

8. Los resultados de los ensayos antitumorales indican que la trichodermina tiene menor actividad pero, a su vez, menor citotoxicidad frente a líneas celulares sanas que el taxol (paclitaxel), un antitumoral no citostático utilizado en el tratamiento de tumores sólidos. Además, la trichodermina presenta una actividad citostática prologada en el tiempo.
9. Los datos de menor emergencia y tamaño de plantas de tomate, y el desarrollo de mayores lesiones necróticas tras inocular artificialmente el patógeno *B. cinerea* en plantas procedentes de semillas tratadas con las cepas de *T. brevicompactum*, silvestre y transformantes, demuestran el efecto fitotóxico tanto de *T. brevicompactum* como de la sobreexpresión del gen *Tbtri5*.
10. Los tamaños y las secuencias de los productos de PCR amplificados a partir de ADN genómico de *T. brevicompactum* IBT 40841 y de *T. arundinaceum* IBT 40837 correspondientes a genes y regiones intergénicas del *cluster tri*, indican que la disposición de los genes es coincidente en ambas especies del género *Trichoderma* pero difiere con la descrita para el *cluster tri* en especies del género *Fusarium*. Además, a diferencia de lo que ocurre en *Fusarium*, en las dos cepas de *Trichoderma* el gen *Tbtri5* está situado fuera del *cluster tri*.
11. La aplicación biotecnológica de *T. brevicompactum* IBT 40841 podría residir en la explotación de las capacidades antimicrobiana y citostática de la trichodermina. Precisamente, a diferencia de otras especies del género *Trichoderma*, estas capacidades invalidan a *T. brevicompactum* como agente de control biológico.

APÉNDICE

1. SECUENCIA DEL GEN *Tbtri5*, Y PARTE DE SU PROMOTOR

```

ggcggttactctcggttactgcgatgaagtttcggaaggattgtattcggtgagagcgacaaggctgtttgacgatggccctagaatgatgcttag 100
tgtgtatcatcatcgatgatgcatactactgatatgtggaggcttacggagtcggaaccgggctctcagaagtgggtcttatctgcttcaattgtattcg 200
ttttggaaattcttcttagtacatatagacgccagattctgtctactctgatctgctcctcattactcaatcagtatctcacacagactacttacaaga 300
tcacaatcacattccatttgccttattcttgtatctctatataacaatcaccctaaatcatcatc ATG GTT GAG CTC AAC GAC GTC CCT 391
M V E L N D V P

GGT GAG GAG GAG TTC CCC CGA GCT ACC TAC TTG GAG ACT ATG GTT CGT CTG TTG GAT ACC GTT AGC TAC AAC GAT 466
G E E E F P R A T Y L E T M V R L L D T V S Y N D

GAA AAC TTC ACA GAT GAG GAA CGT GTT GAG TGC TTG AAG TAT GCT TAC GCA TAC GCA AAA GCT GCC GAG CAT TTT 541
E N F T D E E R V E C L K Y A Y A Y A K A A E H F

GCC CAG CCT CAT GTT CAG GAG ACT TTG AAA GTG CCT CCA AAG CGA ATG GCC GCT GCT CTC AAA ACC ATT GTT GGC 616
A Q P H V Q E T L K V P P K R M A A A L K T I V G

ATG TGT GTT TAC TCA TGG TGC CGC GTA TCC AAA GAG GTC ATG GCC GAT CTC AGC ATC CAC TAC ACA TAC ACT CTG 691
M C V Y S W C R V S K E V M A D L S I H Y T Y T L

CTT CTT GAC GAC AGC AGA GAA GAG CCT GCT GGT ACC ATG GCA ACT TGG TAC GAG GAT CTT CTA AAT GCC CGA CCA 766
L L D D S R E E P A G T M A T W Y E D L L N A R P

CAG GCT CAC GGA TGG TGG AGA CTG GTC AAT GAC TTC ATC CCC AAT GTC CTT CGT CAC TAC GGA GGC TAC TGC CAG 841
Q A H G W W R V N D F I P N V L R H Y G G Y C Q

ATG AAC ATT GTC CGC AGC ACC ATT GAT T gtaagcttccctgcctatcagccatttttggacgtaaatgctaacaacgccaatttag 938
M N I V R S T I D C

TC TTC CAA GGA TGC TGG ATT GAG CAG CAC AAC TTC AAG GGT TTC CGT GGC TCC AGT GAC TAT CCT GGC TTC CTC 1012
S F Q G C W I E Q H N F K G F R G S S D Y P G F L

CGC CGT ATC AAT GGT CTG GGC CAT TGT GTC GGC TCT TCA ATC TGG CCG ATT GAG CTT GTG GAT GAG GAA GAG CAC 1087
R R I N G L G H C V G S S I W P I E L V D E E E H

TTC CTT GAA ATT ACC ACA GCA ATT GCT CAG ATG GAG AAC TGG ATG GTC TGG ACT AAT GAT CTA TTC TCC TTC TAT 1162
F L E I T T A I A Q M E N W M V W T N D L F S F Y

AAG GAG TAC TTC GCT GAA CGT GAT CAG ACC TCC CTG GTC AAT AAC TAC GTA GAG TGC GAA GGT ATT ACT CTC GAT 1237
K E Y F A E R D Q T S L V N N Y V E C E G I T L D

CAG GCT CTC GAT AAG CTC TGC AAA GAT ACT ATT CGA AGC TCT GAA GAG ATT ATC CAG GTC TTC CAC GAC AAG GAT 1312
Q A L D K L C K D T I R S S E E I I Q V F H D K D

CCC AAG ATG TAT GAG ATC CTG ACT CGT TTC ATC CAA GGC TAC ATC ACC TGG CAT TTG TGC GAT GAC CGC TAC CGT 1387
P K M Y E I L T R F I Q G Y I T W H L C D D R Y R

CTA GTC GAG GTC TAC GAA TCC GCC GGA GAT GAC CCC GTT GCC CAG AAG TTC AAG AAA TAT GCT GAG TCT GCT CGC 1462
L V E V Y E S A G D D P V A Q K F K K Y A E S A R

CGT GTT GGC GCC ATA GAC CCT GCT AGG TAC TGC GTA CCC TCG GTT ACC GAG CTA TGC GAG CGT GAG ATG GCC AAG 1537
R V G A I D P A R Y C V P S V T E L C E R E M A K

CAG TCC GCC GGT CGC AGC TGG GAT TTC GGC CTC GGT AAG ATA GCG AGC AAG ATC TCC TCC GTT GCC CAG TAG gcc 1612
Q S A G R S W D F G L G K I A S K I S S V A Q *

atggaccgcttatttcgaggctatgaaa 1639

```

2. SECUENCIA DEL GEN *tri4*

ATG GAT GGC GAG TAT gcacattctctacgtcttttactcagttcagagatttttaattgctgtcgact GGC ACA TAT TTC GCA ACG AAT 89
 M D G E Y G T Y F A T N

 GCG ATG CCT TGG ACG AGA GCG GGC TTC GGG TCC TCG GAT TCC TGG GAA ACG AGC CGA GCT CGA AAA ACC AAG AAA GAT 167
 A M P W T R A G F G S S D S W E T S R A R K T K K D

 CGT GCC ACT ATA GGA GCT TTC TCT CTT CCT CCT GCT ACT GCT GCT ACG GTC GAC CAC CTC CTC CAG TGC CCA AGG GGT 245
 R A T I G A F S L P P A T A A T V D H L L Q C P R G

 GGC TCT CTA AAG CGT TAT TTC CGA AAG AGA ACG GTT GCT CGA GTA GAA CCA ACT ATC CAT ACC TGG ATT ACC TCC TTG 323
 G S L K R Y F R K R T V A R V E P T I H T W I T S L

 CGC TGT AGG TTA TCG AGG CTG GTG GTA TCG ATG AAT TTA CCA AAA GCA AAT CAT CTG GCG TTA AAT CCT CAG TGC TTG 401
 R C R L S R L V V S M N L P K A N H L A L N P Q C L

 TCG GCG CGC TCT CAG ATC CGC ATA TTC CAC CTC AAG AAC GAA CTG TTG CTC GTA TGC TGG ATG AGG GTA CCG TCT TCC 479
 S A R S Q I R I F H L K N E L L L V C W M R V P S S

 TAT TCG CTG GAA CCG AGA CAA CAT CAA GAA CTC TCG GTA TCA CTA TGT TTT ATC TTT AAG CAA CCC GGA TAT TTT GAT 557
 Y S L E P R Q H Q E L S V S L C F I F K Q P G Y F D

 AAA CTT CGT GAG GGA GTT GAA ATT CTT TTG CCA TCT AGC GAG GAT AAC ATG CAC TCT CTG GCA CAA CTC GAA AAC CTC 635
 K L R E G V E I L L P S S E D N M H S L A Q L E N L

 CCT TAT gggtaagctctacaaacgatcgatgaaaggaagcctatctaacaagatgcctctaGAC TGG TGT TGT CCA CGA GGG ACT TCG ACT 727
 P Y D W C C P R G T S T

 TTC ATT CGG TCC CAT AGT CGC TCA TCC AGA GTA GCG ACA CAT GAA GCG TTG CAG TAC AAG GAG CAT ACC ATT CCC GCA 805
 F I R S H S R S S R V A T H E A L Q Y K E H T I P A

 GGC gtgaggacatctttgttccgggtatctccatctgatgacattgctaacaactatgggtattatag ACT CCT GTT AGC CAG TCG ACT TAT TTC 898
 G T P V S Q S T Y F

 GTG CAT ACC GAT ACA GAA ATC TTT CCA GAC CCT TGG GAA TTT AAA CCT GAG CGA TGG ATT AAA GCA GCT GAA GAT GGT 976
 V H T D T E I F P D P W E F K P E R W I K A A E D G

 ATT GCG CTG AAG AAG TAT ATT ACC AAC TTT TCT CAG GGA AGC AGG CAG TGC ATT GGT acaggtaagctcgcctgatcatctcgg 1060
 I A L K K Y I T N F S Q G S R Q C I G

gaaaaagaatcaattaaattgattggggttgaactaacatggcttat AGC ATG TCA TTT GCT GAA ATG TTC TTG ACT CTT TCT AGA ATT 1149
 S M S F A E M F L T L S R I

 ATT CCG GCT TTT GAT CTT GAG CTG TAC GAC ACT ACA AAG GCT TGA cat 1197
 I P A F D L E L Y D T T K A *

3. SECUENCIA DEL GEN *tri6*

ATG AAT GAT GAT AGC GAG ACT CCT GGT GCA GAG GCC TGG ATG GCC TTG CCT CTG TTT AAC CGG AAA GCC TCG CCA GAC 78
 M N D D S E T P G A E A W M A L P L F N R K A S P D
 CAC GAA CAA AAC GTG CTG ACG TGG TTC GAG TGC TGG CGG CCA CCG GAA GAC GAT GTC TCA GAT TTT AAA AGC CTG GAG 156
 H E Q N V L T W F E C W R P P E D D V S D F K S L E
 GAC TAT GAA GAT TCA CCG ACC CAT TCC ATA GGG TCT TCG GTG CTT CAT TCA GGG TCA CTA GAC TCG GAG TAC CAT TAT 234
 D Y E D S P T H S I G S S V L H S G S L D S E Y H Y
 TAC ACT GCA TCC GAC CTT GTT TTT TCC GAC GAT GGT GGA GTA GGC AGG AAC GCA GAC CTG CTG TCC GAA ATC TCG GAT 312
 Y T A S D L V F S D D G G V G R N A D L L S E I S D
 GAC CAC ATT CCA CAA CTT TCA TTT TCT ACA CCT AGC ACA TGC CCG TTT CCC GGG TGC AAA TCT ACC GCT CTC TTC ACT 390
 D H I P Q L S F S T P S T C P F P G C K S T A L F T
 ACT GGG AGG GAT TTT CGA CGC CAT TAT CGC CAA CAC TTT AAG CGT TTT TTT TGT CGT TAC GAG GAA TGC TCG CAA TCT 468
 T G R D F R R H Y R Q H F K R F F C R Y E E C S Q S
 ACG AAT GAT CCA GGT GAC GCT GGT AAA AAG GGC TTC GCA ACT CGT AAG GAT CGT GCG CGC CAC GAG GCT AAA CAC AAC 546
 T N D P G D A G K K G F A T R K D R A R H E A K H N
 CCG GCC ATC AGA TGT CAA TGG CGG GAC AAC AAC GGA GAC CAA TGT ACG AGA ACA TTT AGT CGC ATG GAT AAT ATG AGG 624
 P A I R C Q W R D N N G D Q C T R T F S R M D N M R
 GAC CAC TTT CGA CGA ATT CAT GGG AAA GAA TAA 657
 D H F R R I H G K E *

4. SECUENCIA DEL GEN *tri14*

ATG CAA CCA CAG GTG TTA CTG AGC TCA CTG CTC CCC TTA AGC GAC TAC ATT TCA GGA TGG TCT TGG GGC AGC CTG TTG 78
 M Q P Q V L L S S L L P L S D Y I S G W S W G S L L
 GGA AAT CAA CCA TGT CCA CCT CTG CCG GCA GGT GAT CTT ATC ATG CGG AAA TAT CAG ATG TAT CCT GAG AAC TTC ATG 156
 G N Q P C P P L P A G D L I M R K Y Q M Y P E N F M
 TGG GAC AAA AAA CGC TGT GTT GCC TAT GTC AGC gtatgcccgatgtctcctgagcaactgagatctctttctgatttgcatccaatattctag 248
 W D K K R C V A Y V S
 AAT CTC TAT AAT GCT ACG CTC AGT ATC TAT GAT CCT TAT AAG TCT GAA GTT GTC GAC ACG ATT TCG TTC CCA GGT TTA 326
 N L Y N A T L S I Y D P Y K S E V V D T I S F P G L
 AGC CAC CCA GGG GAC TCT GCT ACG CCA AAT CCT TTG CAT ACC AGT GGA CTA ATT TTA CCG CCG GAC GCA GCT ACT GCC 404
 S H P G D S A T P N P L H T S G L I L R P D A A T A
 GAT CTC TTG GAA ATT GTT ATC GAC AAT GGC GAC TGT TTT TTC AGC AAC GGA AAC AAT GTG TCT GGG CCT GAT TAT CTC 482
 D L L E I V I D N G D C F F S N G N N V S G P D Y L
 CTC ACA ATG GAT CTA AGA ACC AAG AAA GTA ATT TCT CAG ATC CGA CTC AAC GAT ATA AGC AAT GGC ACT TAT GCT GGT 560
 L T M D L R T K K V I S Q I R L N D I S N G T Y A G
 TAT GCT GAT GCT GAG CTT GCA AGC GTG GGA AAC TCT TAC GTT GTT GGC ACC TAC GTG TCT AAC ATC TTG CGC GTT ACA 638
 Y A D A E L A S V G N S Y V V G T Y V S N I L R V T
 CCT CAA TCA GAA GTG TCG ACT TTC TTC GTC CAA GAG CCT CTT GGC CCA CCC CGA GAA TAT GGC TAC ACT GGG CTC GCT 716
 P Q S E V S T F F V Q E P L G P P R E Y G Y T G L A
 CAT GTC GGT AAC GTC CTT CTC TCT AAT GAC AAC ATT GCG AAG CAA TTA GTG CGC TTC GAC ATC CGA GAC GAA AAA GGG 794
 H V G N V L L S N D N I A K Q L V R F D I R D E K G
 ACG CCA GTT TTT ATT CCT CAG ACG CCA TAT CAC GAA TTC ACC ACC TCC AAT GTA ATG AAT TTG CCT GAA AAA TAC AAC 872
 T P V I P Q T P Y H F T S N V M N L P E K Y N
 AAC ACG ATT CTT CTA GCA GCA GAA AAT GTG ACA CCG GAT CAT CCG TCT GGG GGA GTG GCT GTT TGG AGG TCC CGA GAT 950
 N T I L L A A E N V T P D H P S G G V A V W R S R D
 CAG CTA TAC AAT GAG GTC GAG TAT TTG GGT TTC ATT CCC AGC CGG TTG ACC AAC GCC TTA GCG ACA GCT GCT CGG CAA 1028
 Q L Y N E V E Y L G F I P S R L T N A L A T A A R Q
 ATG TCG GAT CGA ATA TAC GTA GTT TCA GTC TAC ACA GAT GGC GCA AAT ATT ACT GTT GCT GGA TAC AGC AGC GAG TTC 1106
 M S D R I Y V V S V Y T D G A N I T V A G Y S S E F
 GTG CTT CAA GAT ATC ACG GTC GAG GTA GAT GCT CTT GTA GCA TGA 1151
 V L Q D I T V E V D A L V A *

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, E. Y., Jiang, Y., Zhang, Y., Son, E. M., You, S., Kang, S. W., Park, J., Jung, J. H., Lee, B. J. y Kim, D. (2008). Cytotoxicity of p-tyrosol and its derivatives may correlate with the inhibition of DNA replication initiation. *Oncol Rep* **19**: 527-534.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de la Cruz, J., Monte, E. y Llobell, A. (2001). Molecular and antifungal properties of an α -1,3-glucanase, AGN13.1, from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5833-5839.
- Akerfelt, M., Trouillet, D., Mezger, V. y Sistonen, L. (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann NY Acad Sci* **1113**: 15-27.
- Alem, M. A., Oteef, M. D., Flowers, T. H. y Douglas, L. J. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell* **5**: 1770-1779.
- Alexander, N. J., McCormick, S. P. y Hohn, T. M. (1999). *tri12*, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Mol Gen Genet* **261**: 977-984.
- Alexander, N. J., McCormick, S. P., Larson, T. M. y Jurgenson, J. E. (2004). Expression of *tri15* in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr Genet* **45**: 157-162.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Bjorkman, T. y Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* 1295-22. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2926-2933.
- Alton, N. K., Buxton, F., Patel, V., Giles, N. H. y Vapnek, D. (1982). 5'-Untranslated sequences of two structural genes in the qa gene cluster of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 1955-1959.
- Andrianopoulos, A. y Timberlake, W. E. (1994). The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**: 2503-2515.
- Arisan-Atac, I., Heidenreich, E. y Kubicek, C. P. (1995). Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. *FEMS Microbiol Lett* **126**: 249-255.
- Arvas, M., Pakula, T., Lanthaler, K., Saloheimo, M., Valkonen, M., Suortti, T., Robson, G. y Penttilä, M. (2006). Common features and interesting differences in transcriptional responses to secretion stress in the fungi *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* **7**: 32.1-32.18.
- Asselbergh, B., de Vleeschauwer, D. y Hofte, M. (2008). Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 709-719.
- Attucci, S., Aitken, S. M., Gulick, P. J. y Ibrahim, R. K. (1995). Farnesyl pyrophosphate synthase from white lupin: molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein. *Arch Biochem Biophys* **321**: 493-500.
- Austin, R., Provart, N. J., Sacadura, N. T., Nugent, K. G., Babu, M. y Saville, B. J. (2004). A comparative genomic analysis of ESTs from *Ustilago maydis*. *Funct Integr Genomics* **4**: 207-218.
- Augustiniak, H., Forche, E., Reichenbach, H., Wray, V., Graefe, U. y Hoefle, G. (1991). Isolation and structure elucidation of ergokonin A and B; two new antifungal sterol antibiotics from *Trichoderma koningii*. *Liebigs Ann Chem* **4**: 361-366.
- Bai, G. H., Desjardins, A. E. y Plattner, R. D. (2002). Deoxynivalenol non producing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* **153**: 91-98.
- Bailey, B. A., Korcak, R. F. y Anderson, J. D. (1993). Sensitivity to an ethylene biosynthesis inducing endoxylanase in *Nicotiana tabacum*-L cv *xanthi* is controlled by a single dominant gene. *Plant Physiol* **101**: 1081-88.
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Roberts, D. P., Thomas, S. E., Crozier, J., Samuels, G. J., Choi, I. Y., Holmes, K. A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* **224**: 1449-64.
- Bakan, B., Giraud-Delville, C., Pinson, L., Richard-Molard, D., Fournier, E. y Brygoo, Y. (2002). Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5472-5479.
- Bao, F., Shen, J., Brady, S. R., Muday, G. K., Asami, T. y Yang, Z. (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**: 1624-1631.
- Bartizal, K., Abruzzo, G., Trainor, C., Krupa, D., Nollstadt, K., Schmatz, D., Hammond, M., Balkovec, J. y Vanmiddlesworth, F. (1992). *In vitro* antifungal activities and in vivo efficacies of 1,3- β -D-glucan synthesis inhibitors L-671,329, L-646,991, tetrahydroechinocandin B, and L-687,781, a papulacandin. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1648-1657.

- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* **45**: 493-496.
- Benhamou, N. y Chet, I. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the mycoparasitic process. *Phytopathology* **83**: 1062-1071.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* **7**: 249-260.
- Bennett, J. W. y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* **16**: 497-516.
- Berg, A., Wangun, H. V., Nkengfack, A. E. y Schlegel, B. (2004). Lignoren, a new sesquiterpenoid metabolite from *Trichoderma lignorum* HKI 0257. *J Basic Microbiol* **44**: 317-319.
- Bernini, R., Mincione, E., Barontini, M. y Crisante, F. (2008). Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol. *J Agric Food Chem* **56**: 8897-8904.
- Binder, J. (1999). A yeast bioassay for trichothecenes. *Nat Toxins* **7**: 401-406.
- Bisset, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can J Bot* **69**: 2357-2372.
- Boonsri, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantapromma, S. y Kanjana-Opas, A. (2008). Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Thespesia populnea*. *J Nat Prod* **71**: 1173-1177.
- Borneman, A. R., Hynes, M. J. y Andrianopoulos, A. (2000). The *abaA* homologue of *Penicillium marneffei* participates in two developmental programmes: conidiation and dimorphic growth. *Mol Microbiol* **38**: 1034-1047.
- Boussen, H., Cristofanilli, M., Zaks, T., Desilvio, M., Salazar, V. y Spector, N. (2010). Phase II study to evaluate the efficacy and safety of neoadjuvant lapatinib plus paclitaxel in patients with inflammatory breast cancer. *J Clin Oncol* (en prensa).
- Boutigny, A. L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M. N., Pinson-Gadais, L. y Richard-Forget, F. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol Res* **113**: 746-753.
- Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H. y Desjardins, A. E. (2001). A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol* **32**: 121-133.
- Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H. y Desjardins, A. E. (2002). Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genet Biol* **36**: 224-233.
- Brown, D. W., Proctor, R. H., Dyer, R. B. y Plattner, R. D. (2003). Characterization of a *Fusarium* 2-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. *J Agric Food Chem* **51**: 7936-7944.
- Brown, D. W., Dyer, R. B., McCormick, S. P., Kendra, D. F. y Plattner, R. D. (2004). Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genet Biol* **41**: 454-462.
- Brown, V., Sabina, J. y Johnston, M. (2009). Specialized sugar sensing in diverse fungi. *Curr Biol* **19**: 436-441.
- Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S. y Kubicek, C. P. (2003). The *nag1* N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* **43**: 289-295.
- Cao, L., Jiang, M., Zeng, Z., Du, A., Tan, H. y Liu, Y. (2008). *Trichoderma atroviride* F6 improves phytoextraction efficiency of mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere* **71**: 1769-1773.
- Cane, D. E., Q. Xue. y B. C. Fitzsimons. (1996). Trichodiene synthase. Probing the role of the highly conserved aspartate rich region by site directed mutagenesis. *Biochemistry* **35**: 12369-12376.
- Cane, D. E. y Bowser, T. E. (1999). Trichodiene synthase: mechanism-based inhibition of a sesquiterpene cyclase. *Bioorg Med Chem Lett* **9**: 1127-1132.
- Caracuel, Z., Casanova, C., Roncero, M. I., Di, P. A. y Ramos, J. (2003). pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na⁺-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell* **2**: 1246-1252.

- Cardoza, R. E., Hermosa, M. R., Vizcaíno, J. A., Sans, L., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2005). Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. En *Microorganism for industrial enzymes and biocontrol*. Mellado E. y Barredo J. L (eds). Reseachs Signpost, Kerala, India. pp.1-22.
- Cardoza, R. E., Vizcaíno, J. A., Hermosa, M. R., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2006a). Transformation of four *Trichoderma* strains mediated by *Agrobacterium* or based in the isolation of protoplast. A comparison of the phenotypic and genetic stability of the transformants isolated by these procedures. *J Microbiol* **44**: 383-395.
- Cardoza, R. E., Vizcaíno, J. A., Hermosa, M. R., Sousa, S., González, F. J., Llobell, A., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2006b). Cloning and characterization of the *erg1* gene of *Trichoderma harzianum*: effect of the *erg1* silencing on ergosterol biosynthesis and resistance to terbinafine. *Fungal Genet Biol* **43**: 164-178.
- Cardoza, R. E., Hermosa, M. R., Vizcaíno, J. A., González, F., Llobell, A., Monte, E. y Gutiérrez, S. (2007). Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity. *Fungal Genet Biol* **44**: 269-283.
- Carrasco, L., Barbacid, M. y Vázquez, D. (1973). The trichodermin group of antibiotics, inhibitors of peptide bond formation by eukaryotic ribosomes. *Biochim Biophys Acta* **312**: 368-376.
- Carter, C. J., Cannon, M. y Smith, K. E. (1976). Inhibition of protein synthesis in reticulocyte lysates by trichodermin. *Biochem J* **154**: 171-178.
- Cervia, D., García-Gil, M., Simonetti, E., Di, G. G., Guella, G., Bagnoli, P. y Dini, F. (2007). Molecular mechanisms of euplotin C induced apoptosis: involvement of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and proteases. *Apoptosis* **12**: 1349-1363.
- Chacón, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A., Delgado-Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int. Microbiol.* **10**: 19-27.
- Chambergro, F. S., Bonaccorsi, E. D., Ferreira, A. J., Ramos, A. S., Ferreira Júnior, JR., Brahão-Neto, J., Farah, J. P. y El-Dorry, H. (2002). Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J Biol Chem* **277**: 13983-13988.
- Champney, W. S. y Burdine, R. (1995). Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2141-2144.
- Chang, Y. C., Chang, Y., Baker, R., Kleifeld, O. y Chet, I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* **70**: 145-148.
- Chaverri, P., Samuels, G. J. y Stewart, E. L. (2001). *Hypocrea virens* sp nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia* **93**: 1113-24.
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J. y Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol* **27**: 302-313.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J. y Fink, G. R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 5048-5052.
- Chen, S. Y., Zhang, C. L., Chen, Y. Z. y Lin, F. C. (2008). Trichodermin (4 β -acetoxy-12,13-epoxytrichothec-9-ene). *Acta Cryst.* E64, o702.
- Chet, I., Benhamou, N. y Haran, S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol.2). Kubicek, C. P. y Harman, G. E. (eds). Taylor and Francis, Londres, Reino Unido, pp.153-172.
- Chinworrungsee, M., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Chuailua, P. y Suksamrarn, A. (2008). Cytotoxic activities of trichothecenes isolated from an endophytic fungus belonging to order Hypocreales. *Arch Pharm Res* **31**: 611-616.
- Chou, Y. Y., Lin, T. Y., Lin, J. C., Wang, N. C., Peng, M. Y. y Chang, F. Y. (2008). Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Microbiol Immunol Infect* **41**: 124-129.
- Chugh, J. K. y Wallace, B. A. (2001). Peptaibols: models for ion channels. *Biochem Soc Trans* **29**: 565-570.
- Chung, H. Y., Lee, J. S., Lee, Y. y Young, C. Y. (2006). Perillyl alcohol inhibits the expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Cancer Lett* **236**: 222-228.
- Conrath, U., Pieterse, C. M. y Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* **7**: 210-216.

- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. y López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**: 1579-1592.
- Cooney, J. M. y Lauren, D. R. (1999). Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-N-pentyl-2H-pyran-2-one (6PAP) by selected fungal isolates. *J Nat Prod* **62**: 681-683.
- Corley, D. G., Miller-Wideman, M. y Durley, R. C. (1994). Isolation and structure of harzianum A: a new trichothecene from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod* **57**: 422-425.
- Covarelli, L., Turner, A. S. y P. Nicholson (2004). Repression of deoxynivalenol accumulation and expression of *tri* genes in *Fusarium culmorum* by fungicides *in vitro*. *Plant Pathology* **53**: 22-28.
- Covas, M. I., Miró-Casas, E., Fitó, M., Farré-Albadalejo, M., Gimeno, E., Marrugat, J. y de la Torre, R. (2003). Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs Exp Clin Res* **29**: 203-206.
- Cutler, H. G. y LeFiles, J. (1978). Trichodermin: Effects on plants. *Plant Cell Physiol* **19**: 177-182.
- Cutler, S. R., Rodríguez, P. L., Finkelstein, R. R. y Abrams, S. R. (2010). Absciscic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651-679.
- Cundliffe, E., Cannon, M. y Davies, J. (1974). Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 30-34.
- Dana, M. M., Pintor-Toro, J. A. y Cubero, B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiol* **142**: 722-730.
- Daoubi, M., Pinedo-Rivilla, C., Rubio, M. R., Hermosa, M. R., Monte, E., Aleu, J. y Collado, I. G. (2009). Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma* spp. *Tetrahedron* **65**: 4834-4840.
- Daum, M., Herrmann, S., Wilkinson, B. y Bechthold, A. (2009). Genes and enzymes involved in bacterial isoprenoid biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* **13**: 180-188.
- Davis, R. A., Longden, J., Avery, V. M. y Healy, P. C. (2008). The isolation, structure determination and cytotoxicity of the new fungal metabolite, trichodermamide C. *Bioorg Med Chem Lett* **18**: 2836-2839.
- Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B. y Gräfe, U. (2003). The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *J Pept Sci* **9**: 666-678.
- Degenkolb, T., Dieckmann, R., Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Theis, Ch., Zafari, D., Chaverri, P., Ismaiel, A., Brückner, H., Von Döhren, H., Thrane, U., Petrini, O. y Samuels, G. J. (2008a). The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycol Progress* **7**: 177-219.
- Degenkolb, T., Von Döhren, H., Nielsen, K. F., Samuels, G. J. y Brückner, H. (2008b). Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem Biodivers* **5**: 671-680.
- de Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J. y Beijersbergen, A. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* **16**: 839-842.
- Delgado-Jarana, J., Sousa, S., González, F., Rey, M. y Llobell, A. (2006). ThHog1 controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* **152**: 1687-1700.
- Della, S. F., Ciafre, S. A., Marck, C., Santoro, B., Presutti, C., Sentenac, A. y Bozzoni, I. (1990). The ABF1 factor is the transcriptional activator of the L2 ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**: 2437-2441.
- de la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benítez, T., Pintor-Toro, J. A y Llobell, A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur J Biochem* **206**: 859-867.
- de la Cruz, J., Rey, M., Lora, J. M., Hidalgo-Gallego, A., Domínguez, F., Pintor-Toro, J. A., Llobell, A. y Benítez, T. (1993). Carbon source control on β -glucanase, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch Microbiol* **159**: 316-322.
- de la Cruz, J., Pintor-Toro, J., Benítez, T., Llobell, A. y Romero, L. C. (1995a). A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* **177**: 6937-6945.

- de la Cruz, J., Pintor-Toro, J., Benítez, T. y Llobell, A. (1995b). Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* related to its mycoparasitism. *J Bacteriol* **177**: 1864-1871.
- Deng, S., Lorito, M., Penttilä, M. y Harman, G. E. (2007). Overexpression of an endochitinase gene (*ThEn-42*) in *Trichoderma atroviride* for increased production of antifungal enzymes and enhanced antagonist action against pathogenic fungi. *Appl Biochem Biotechnol* **142**: 81-94.
- de Sordi, L. y Muhlschlegel, F. A. (2009). Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS Yeast Res* **9**: 990-999.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D. y Vanmiddlesworth, F. (1986). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*: Origin of the oxygen atoms of T2 toxin. *Appl Environ Microbiol* **51**: 493-497.
- Desjardins, A. E., Hohn, T. M. y McCormick, S. P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol Rev* **57**: 595-604.
- de Vries, R. P. y Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 497-522.
- Dickinson, J. M. (1993). Microbial pyran-2-ones and dihydropyran-2-ones. *Nat Prod Rep* **10**: 71-98.
- Diener, S. E., Dunn-Coleman, N., Foreman, P., Houfek, T. D., Teunissen, P. J., van Solingen, P., Dankmeyer, L., Mitchell, T. K., Ward, M. y Dean, R. A. (2004). Characterization of the protein processing and secretion pathways in a comprehensive set of expressed sequence tags from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 275-282.
- Distefano, G., La Malfa, S., Vitale, A., Lorito, M., Deng, Z. y Gentile, A. (2008). Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Res* **17**: 873-879.
- Dodd, S. L., Lieckfeldt, E. y Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea atroviridis* sp nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* **95**: 27-40.
- Dower, W. J., Miller, J. F. y Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Druzhinina, I. y Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J Zhejiang Univ Sci B* **6**: 100-112.
- Dubos, B., Jailloux, F. y Bulit, J. (1982). Protection du vignoble contre la pourriture grise: les propriétés antagonistes du *Trichoderma* à l'égard du *Botrytis cinerea*. *Colloques de l'INPAS* **11**: 205-219.
- Dudareva, N., Pichersky, E. y Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* **135**: 1893-1902.
- Dudareva, N. y Pichersky, E. (2008). Metabolic engineering of plant volatiles. *Curr Opin Biotechnol* **19**: 181-189.
- Dyer, R. B., Plattner, R. D., Kendra, D. F. y Brown, D. W. (2005). *Fusarium graminearum tri14* is required for high virulence and DON production on wheat but not for DON synthesis in vitro. *J Agric Food Chem* **53**: 9281-9287.
- Ebbole, D. J., Jin, Y., Thon, M., Pan, H., Bhattarai, E., Thomas, T. y Dean, R. (2004). Gene discovery and gene expression in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*: analysis of expressed sequence tags. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1337-1347.
- Elad, Y., Barak, R. y Chet, I. (1984). Parasitism of sclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* **28**: 719-725.
- Fabiani, R., Rosignoli, P., de Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G. F. y Morozzi, G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr* **138**: 1411-1416.
- Fekete, C., Logrieco, A., Giczey, G. y Hornok, L. (1997). Screening of fungi for the presence of the trichodiene synthase encoding sequence by hybridization to the *tri5* gene cloned from *Fusarium poae*. *Mycopathologia* **138**: 91-97.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Fernandes, M., Xiao, H. y Lis, J. T. (1994). Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res* **22**: 167-173.
- Fernández-Lobato, M., Cannon, M., Mitlin, J. A., Mount, R. C. y Jiménez, A. (1990). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying high level or low level resistance to trichothecene antibiotics. *Biochem J* **267**: 709-713.

- Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N. S., Goedegebuur, F., Houfek, T., D., England, G. J., Kelley, A. S., Meerman, H. J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H. A., Teunissen, P. J., Yao, J. y Ward, M. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* **278**: 31988-31997.
- Freimoser, F. M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G. y St Leger, R. J. (2003). Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology* **149**: 239-247.
- Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A. y Murray, N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J Mol Biol* **170**: 827-842.
- Fujita, T., Takaishi, Y., Okamura, A., Fujita, E., Fuji, K., Hratsuoka, N., Komatsu, M. y Arita, I. (1981). New peptide antibiotics, trichopolyns I and II from *Trichoderma polysporum*. *J Chem Soc Chem Commun* **9**: 585-587.
- Fujita, T., Wada, S., Iida, A., Nishimura, T., Kanai, M. y Toyama, N. (1994). Fungal metabolites. XIII. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, trichodecenins-I and -II, from *Trichoderma viride*. *Chem Pharm Bull* **42**: 489-494.
- García, I., Lora, J. M., de la Cruz, J., Benítez, T., Lobell, A. y Pintor-Toro, J. A. (1994). Cloning and characterization of a chitinase (*chit42*) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **27**: 83-89.
- Gallo, A., Mulé, G., Favilla, M. y Altomare, M. (2004). Isolation and characterisation of a trichodiene synthase homologous gene in *Trichoderma harzianum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **65**: 11-20.
- Gams, W. y Meyer, W. (1998). What exactly is *Trichoderma harzianum*? *Mycologia* **90**: 904-915.
- Garo, E., Starks, C. M., Jensen, P. R., Fenical, W., Lobkovsky, E. y Clardy, J. (2003). Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine derived fungus *Trichoderma virens*. *J Nat Prod* **66**: 423-426.
- Ge, H., Walhout, A. J. y Vidal, M. (2003). Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet* **19**: 551-560.
- Geremía, R. A., Golsman, G. H., Jacobs, D., Ardiles, W., Villa, S. B., Van Montagu, M. y Herrera-Estrella, A. (1993). Molecular characterization of the proteinase encoding gene *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol Microbiol* **8**: 603-613.
- Gershenzon, J. y Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* **3**: 408-414.
- Georgopadakou, N. H. y Walsh, T. J. (1994). Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **264**: 371-373.
- Ghisalberti, E. L., Hockless, D. C. R., Rowland, C. y White, A. H. (1992). Harziandione, a new class of diterpene from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod* **55**: 1690-1694.
- Ghisalberti, E. L. y Rowland, C. Y. (1993). Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod* **56**: 1799-1804.
- Gilly, M., Benson, N. R. y Pellegrini, M. (1985). Affinity labeling the ribosome with eukaryotic specific antibiotics (bromoacetyl) trichodermin. *Biochemistry* **24**: 5787-5792.
- Godtfredsen, W. O. y Vangedal, S. (1965). Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic. *Acta Chem Scand* **19**: 1088-1102.
- Goldman, G. H., Pellizzon, C. H., Malnerney, J. O. y Golman, M. H. S. (1998). *Trichoderma* spp. genome and gene structure. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol.1). Kubicek C. P. y Harman G. E. (eds). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. pp. 209-224.
- Goodwin, S. B., van der Lee, T. A., Cavaletto, J. R., Te Lintel, H. B., Crane, C. F. y Kema, G. H. (2007). Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellite loci from an EST database of the *Septoria tritici* blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet Biol* **44**: 398-414.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. y Schüller, C. (1998). Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* **12**: 586-597.
- Grinyer, J., McKay, M., Herbert, B. y Nevalainen, H. (2004). Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. *Curr Genet* **45**: 170-75.

- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., Monte, E. y García-Acha, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3189-3198.
- Grove, J. F. (1988). Non-macrocytic trichothecenes. *Nat Prod Rep* **5**: 187-209.
- Grove, J. F. (2007). The trichothecenes and their biosynthesis. *Fortschr Chem Org Naturst* **88**: 63-130.
- Grünler, J., Ericsson, J. y Dallner, G. (1994). Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1212**: 259-277.
- Gurr, S. J., Unkles, S. E. y Kinghorn, J. R. (1987). The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. En: Kinghorn J. R (eds). *Gene structure in eukaryotic microbes*. IRL Press, Oxford, Reino Unido. pp. 93-139.
- Gutiérrez, V. R., de la Puerta, R. y Catalá, A. (2001). The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* **217**: 35-41.
- Ha, J. F., Italiano, C. M., Heath, C. H., Shih, S., Rea, S. y Wood, F. M. (2010). Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. *Burns* (en prensa).
- Hadibarata, T., Tachibana, S. y Itoh, K. (2007). Biodegradation of phenanthrene by fungi screened from nature. *Pak J Biol Sci* **10**: 2535-2543.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Handelsman, J. y Stabb, E.V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* **8**: 1855-1869.
- Hanson, J. R. 2005. The chemistry of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Sci Prog* **88**: 237-248.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research in *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis* **84**: 377-393.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* **2**: 43-56.
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **96**: 190-194.
- Hayes, C. K., Klemsdal, S., Lorito, M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Nakas, J. P., Tronsmo, A. y Harman, G. E. (1994). Isolation and sequence of an endochitinase encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene* **138**: 143-148.
- Heil, M. y Silva Bueno, J. C. (2007). Within plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 5467-5472.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Díaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E. y García-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1890-1898.
- Hermosa, M. R., Grondona, I., Díaz-Minguez, J. M., Iturriaga, E. A. y Monte, E. (2001). Development of a strain specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr Genet* **38**: 343-350.
- Hermosa, M. R., Keck, E., Chamorro, I., Rubio, B., Sanz, L., Vizcaino, J. A., Grondona, I. y Monte, E. (2004). Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol Res* **108**: 897-906.
- Hohn, T. M. y Beremand, P. D. (1989). Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* **79**: 131-138.
- Hohn, T. M. y Plattner, R. D. (1989). Expression of the trichodiene synthase gene of *Fusarium sporotrichioides* in *Escherichia coli* results in sesquiterpene production. *Arch Biochem Biophys* **275**: 92-97.
- Hohn, T. M. y Desjardins, A. E. (1992). Isolation and gene disruption of the *tox5* gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 249-256.
- Hohn, T. M., Desjardins, A. E. y McCormick, S. P. (1993). Analysis of *tox5* gene expression in *Gibberella pulicaris* strains with different trichothecene production phenotypes. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2359-2363.
- Hohn, T. M., Krishna, R. y Proctor, R. H. (1999). Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genet Biol* **26**: 224-235.

- Hooykaas, P. J., Roobol, C. y Schilperoort, R. A. (1979). Regulation of the transfer of Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Gen Microbiol* **110**: 99-109.
- Howell, C. R. y Stipanovic, R. C. (1995). Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* **85**: 469-472.
- Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D. y Puckhaber, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* **90**: 248-252.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* **87**: 4-7.
- Howell, C. R. (2006). Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* **96**: 178-180.
- Huang, Q., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Nishi, A., Tubaki, K. y Tanaka, K. (1995). Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. II. Metabolites of *Trichoderma koningii*. *Chem Pharm Bull* **43**: 223-229.
- Hussain, S. A., Noorani, R. y Qureshi, I. H. (1975). Microbial chemistry. Part I. Isolation and characterization of gliotoxin, ergosterol, palmitic acid and mannitol-metabolic products of *Trichoderma hamatum*. *Pak J Sci Ind Res* **18**: 221-223.
- Hutchinson, C. R., Kennedy, J., Park, C., Kendrew, S., Auclair, K. y Vederas, J. (2000). Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**: 287-295.
- Hynes, M. J. (2003). The *Neurospora crassa* genome opens up the world of filamentous fungi. *Genome Biol* **4**: 217.1-217.4.
- Inbar, J. y Chet, I. (1996). The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. *Adv Exp Med Biol* **408**: 229-231.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ishibashi, K., Kuwabara, K., Ishiguro, T., Ohsawa, T., Okada, N., Miyazaki, T., Yokoyama, M. y Ishida, H. (2009). Short term intravenous antimicrobial prophylaxis in combination with preoperative oral antibiotics on surgical site infection and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in elective colon cancer surgery: results of a prospective randomized trial. *Surg Today* **39**: 1032-1039.
- Jakupovic, M., Heintz, M., Reichmann, P., Mendgen, K. y Hahn, M. (2006). Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Fungal Genet Biol* **43**: 8-19.
- Jaworski, A., Kirschbaum, J. y Bruckner, H. (1999). Structures of trichovirins II, peptaibol antibiotics from the mold *Trichoderma viride* NRRL 5243. *J Pept Sci* **5**: 341-351.
- Jeger, M. J., Jeffries, P., Elad, Y. y Xu, X. M. (2009). A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases. *J Theor Biol* **256**: 201-214.
- Jen, W. C., Jones, G. A., Brewer, D., Parkinson, V. O. y Taylor, A. (1987). The antibacterial activity of alamethicins and zervamicins. *J Appl Bacteriol* **63**: 293-298.
- Jeoh, T., Michener, W., Himmel, M. E., Decker, S. R. y Adney, W. S. (2008). Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. *Biotechnol Biofuels* **1**: 10.
- Jiao, F., Kawakami, A. y Nakajima, T. (2008). Effects of different carbon sources on trichothecene production and *tri* gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett* **285**: 212-219.
- Jiménez-Díaz, I., Ballesteros, O., Zafra-Gómez, A., Crovetto, G., Vilchez, J. L., Navalon, A., Verge C. y de Ferrer, J. A. (2010). New sample treatment for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in agricultural soils. *Chemosphere* **80**: 248-255.
- Jin, H. Z., Lee, J. H., Zhang, W. D., Lee, H. B., Hong, Y. S., Kim, Y. H. y Lee, J. J. (2007). Harzianum A and B produced by a fungal strain, *Hypocrea* sp. F000527, and their cytotoxicity against tumor cell lines. *J Asian Nat Prod Res* **9**: 203-207.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292**: 195-202.
- Ju, W., Yoo, B. C., Kim, I. J., Kim, J. W., Kim, S. C. y Lee, H. P. (2009). Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high density oligonucleotide microarrays. *Oncol Res* **18**: 47-56.

- Juan, M. E., Wenzel, U., Daniel, H. y Planas, J. M. (2008). Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Mol Nutr Food Res* **52**: 595-599.
- Kamal, A., Akhtar, R. y Qureshi, A. A. (1971). Biochemistry of microorganisms. XX. 2,5-Dimethoxybenzoquinone, tartronic acid, itaconic acid, succinic acid, pyrocalciferol, epifriedlinol, lanosta-7,9(11), 24-triene-3- β -21-diol, trichodermane-A, methyl 2,4,6-octatrienecarboxylate, cordycepic acid, *Trichoderma* metabolic products. *Pak J Sci Ind Res* **14**: 71-78.
- Kawasaki, B. T., Hurt, E. M., Kalathur, M., Duhagon, M. A., Milner, J. A., Kim, Y. S. y Farrar, W. L. (2009). Effects of the sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor initiating cells: An integrated molecular profiling approach. *Prostate* **69**: 827-837.
- Keeling, C. I., Weisshaar, S., Lin, R. P. y Bohlmann, J. (2008). Functional plasticity of paralogous diterpene synthases involved in conifer defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 1085-1090.
- Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S. G., Park, C., Vederas, J. C. y Hutchinson, C. R. (1999). Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* **284**: 1368-1372.
- Keon, J., Antoniow, J., Rudd, J., Skinner, W., Hargreaves, J. y Hammond-Kosack, K. (2005). Analysis of expressed sequence tags from the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). *Fungal Genet Biol* **42**: 376-389.
- Keszler, A., Forgacs, E., Kotai, L., Vizcaino, J. A., Monte, E. y García-Acha, I. (2000). Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid phase extraction and gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* **38**: 421-424.
- Kimura, M., Matsumoto, G., Shingu, Y., Yoneyama, K. y Yamaguchi, I. (1998). The mystery of the trichothecene 3-O-acetyltransferase gene. Analysis of the region around *tri101* and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichioides*. *FEBS Lett* **435**: 163-168.
- Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T. J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T. y Yamaguchi, I. (2003). The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Lett* **539**: 105-110.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S. y Fujimura, M. (2007). Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 2105-2123.
- Kirby, J. y Keasling, J. D. (2009). Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 335-55.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. y Stappers, J. A. (2001). Ainsworth y Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- Kjaerulff, S., Dooijes, D., Clevers, H. y Nielsen, O. (1997). Cell differentiation by interaction of two HMG-box proteins: Mat1-Mc activates M cell-specific genes in *S. pombe* by recruiting the ubiquitous transcription factor Ste11 to weak binding sites. *EMBO J* **16**: 4021-4033.
- Kjaerulff, S., Andersen, N. R., Borup, M. T. y Nielsen, O. (2007). Cdk phosphorylation of the Ste11 transcription factor constrains differentiation specific transcription to G1. *Genes Dev* **21**: 347-359.
- Klein, D. y Eveleigh, D. E. (1998). Ecology of *Trichoderma*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol.1). Kubicek, C. P. y Harman, G. E. (eds). Taylor and Francis, Londres, Reino Unido. pp.57-74.
- Kobayashi, T., Abe, K., Asai, K., Gomi, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kitamoto, K., Takeuchi, M. y Machida, M. (2007). Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 646-670.
- Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C. P. y Druzhinina, I. S. (2007). Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7415-7426.
- Konishi, K., Iida, A., Kaneko, M., Tomioka, K., Tokuda, H., Nishino, H. y Kumeda, Y. (2003). Cancer preventive potential of trichothecenes from *Trichothecium roseum*. *Bioorg Med Chem* **11**: 2511-2518.
- Korolev, N., Rav, D. D. y Elad, Y. (2008). The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma* induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *BioControl* **53**: 667-683.
- Koster, B., Wong, B., Straus, N. y Malloch, D. (2009). A multi-gene phylogeny for *Stachybotrys* evidences lack of trichodiene synthase (*tri5*) gene for isolates of one of three intrageneric lineages. *Mycol Res* **113**: 877-886.
- Kraus, G. F.; Druzhinina, I., Gams, W.; Bissett, J.; Zafari, D.; Szakacs, G.; Koptchinski, A.; Prillinger, H. y Zare, R. (2004). *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. *Mycologia* **96**: 1059-1073.

- Kruppa, M. (2009). Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* **52**: 1-10.
- Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C. y Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol* **38**: 310-319.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T. y Kubicek, C. P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7755-7760.
- Kullnig-Gradinger, C.M, Mach, R. L., Lorito, M. y Kubicek, C. P. (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2232-2234.
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G. y Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma* a multigene approach. *Mycol Res* **106**: 757-767.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. y Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* **9**: 299-306.
- Kumeda, Y., Asao, T., Iida, A., Wada, S., Futami, S. y Fujita, T. (1994). Effects of ergokonin A produced by *Trichoderma viride* on the growth and morphological development of fungi. *Bokin Bobai* **22**: 663-670.
- Kuo, M. H. y Grayhack, E. (1994). A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol Cell Biol* **14**: 348-359.
- Kurischko, C., Schilhabel, M. B., Kunze, I. y Franzl, E. (1999). The MATA locus of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* consists of two divergently oriented genes. *Mol Gen Genet* **262**: 180-188.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Laule, O., Furholz, A., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P. B., Grissem, W. y Lange, M. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6866-6871.
- Lazo, G. R., Stein, P. A. y Ludwig, R. A. (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**: 963-967.
- Lee, S. H., Kim, B. G., Kim, K. J., Lee, J. S., Yun, D. W., Hahn, J. H., Kim, G. H., Lee, K. H., Suh, D. S., Kwon, S. T., Lee, C. S. y Yoo, Y. B. (2002). Comparative analysis of sequences expressed during the liquid cultured mycelia and fruit body stages of *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet Biol* **35**: 115-134.
- Lee, H. B., Kim, Y., Jin, H. Z., Lee, J. J., Kim, C. J., Park, J. Y. y Jung, H. S. (2005). A new *Hypocrea* strain producing harzianum A cytotoxic to tumour cell lines. *Lett Appl Microbiol* **40**: 497-503.
- Lee, N. H. y Saeed, A. I. (2007) Microarrays: an overview. *Methods Mol Biol* **353**: 265-300.
- Lee, S. S., Kim, H. S., Kang, H. J., Kim, J. K. y Chung, D. R. (2007). Rapid spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a new hospital in the broad-spectrum antibiotic era. *J Infect* **55**: 358-362.
- Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A. y Madelmont, J. C. (2003). Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta Med* **69**: 402-407.
- Lewis, J. A. y Papavizas, G. C. (1984). A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potencial biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology* **74**: 1240-1244.
- Liang, P. H., Ko, T. P. y Wang, A. H. (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem* **269**: 3339-3354.
- Liebgott, P. P., Labat, M., Amouric, A., Tholozan, J. L. y Lorquin, J. (2008). Tyrosol degradation via the homogentisic acid pathway in a newly isolated *Halomonas* strain from olive processing effluents. *J Appl Microbiol* **105**: 2084-2095.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I. y Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Appl Environ Microbiol* **65**: 2418-2428.
- Limón, M. C., Lora, J. M., García, I., de la Cruz, J., Llobell, A., Benítez, T. y Pintor-Toro, J. A. (1995). Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **28**: 478-483.

- Limón, M. C., Pintor-Toro, J. A. y Benítez, T. (1999). Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* **89**: 254-261.
- Liu, P. G. y Yang, Q. (2005). Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Res Microbiol* **156**: 416-423.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT). *Methods* **25**: 402-408.
- Lo, C. T., Nelson, E. B. y Harman, G. E. (1996). Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* **80**: 730-741.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., Woo, S. L. y Harman, G. E. (1994a). Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **84**: 398-405.
- Lorito, M., Mach, R. L., Sposato, P., Strauss, J., Peterbauer, C. K. y Kubicek, C. P. (1996a). Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14868-14872.
- Lorito, M., Woo, S. L., Donzelli, B. y Scala, F. (1996b). Synergistic, antifungal interactions of chitinolytic enzymes from fungi, bacteria and plants. En *Chitin Enzymology* (vol.2). Muzzarelli, R. A. A. (eds). Atec Edizioni, Ancona, Italia. pp. 3034-3041.
- Lorito, M., Woo, S. L., García, I., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S. y Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungus as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7860-7865.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. y Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'Omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 19.1-19.23.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. y Jansson, J. K. (2004). *In vivo* study of *Trichoderma* pathogen plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3073-3081.
- Lu, H. y Waxman, D. J. (2005). Antitumor activity of methoxymorpholinyl doxorubicin: potentiation by cytochrome P450 3A metabolism. *Mol Pharmacol* **67**: 212-219.
- Mach, R. L., Schindler, M. y Kubicek, C. P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet* **25**: 567-570.
- Mach, R. L. y Zeilinger, S. (1998). Genetic transformation of *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol.1). Kubicek, C. P. y Harman, G. E. (eds). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. pp. 225-242.
- Mach, R. L., Peterbauer, C. K., Payer, K., Jaksits, S. L., Zeilinger, S., Kullning, C. M., Lorito, M. y Kubicek, C. P. (1999). Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1858-1863.
- Manfredi, J. J., Parness, J. y Horwitz, S. B. (1982). Taxol binds to cellular microtubules. *J Cell Biol* **94**: 688-696.
- Martín, L. J., Doebler, J. A. y Anthony, A. (1986). Scanning cytophotometric analysis of brain neuronal nuclear chromatin changes in acute T2 toxin-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **85**: 207-214.
- Martín, R., Ibeas, E., Carvalho-Tavares, J., Hernández, M., Ruiz-Gutiérrez, V. y Nieto, M. L. (2009). Natural triterpenic diols promote apoptosis in astrocytoma cells through ROS-mediated mitochondrial depolarization and JNK activation. *PLoS One* **4**: e5975.
- Martínez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P. M., Cullen, D., Danchin, E. G., Grigoriev, I. V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C.P., Han, C. S., Ho, I., Larrondo, L. F., de Leon, A. L., Magnuson, J. K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A. A., Schmöll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvine, A., Schoch, C. L., Yao, Y., Barabote, R., Nelson, M. A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C. R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D. S., Lucas, S. M., Rubin, E. M. y Dunn-Coleman, N. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol* **26**: 553-560.
- Masuda, D., Ishida, M., Yamaguchi, K., Yamaguchi, I., Kimura, M. y Nishiuchi, T. (2007). Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **58**: 1617-1626.
- Masumoto, N., Korin, M. y Ito, M. (2010). Geraniol and linalool synthases from wild species of perilla. *Phytochemistry* **71**: 1068-1075.

- Matoba, S. y Ogrydziak, D. M. (1998). Another factor besides hydrophobicity can affect signal peptide interaction with signal recognition particle. *J Biol Chem* **273**: 18841-18847.
- McLaughlin, C. S., Vaughan, M. H., Campbell, I. M., Wei, C. M., Stafford, M. E. y Hansen, B. S. (1977). Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. En *Mycotoxins in human and animal health* (vol.1). Rodericks J. V, Hesseltine C. W, Mehliman M. A. (eds). Pathotox Publishers, Park Forest Sound, Illinois, EE.UU. pp. 263-273.
- McCormick, S. P., Alexander, N. J., Trapp, S. E. y Hohn, T. M. (1999). Disruption of *tri101*, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5252-5256.
- McCormick, S. P., Alexander, N. J. y Proctor, R. H. (2006). *Fusarium tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Can J Microbiol* **52**: 636-642.
- McGarvey, D. J. y Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1015-1026.
- Mead, J., Bruning, A. R., Gill, M. K., Steiner, A. M., Acton, T. B. y Vershon, A. K. (2002). Interactions of the Mcm1 MADS box protein with cofactors that regulate mating in yeast. *Mol Cell Biol* **22**: 4607-4621.
- Meek, I. B., Peplow, A. W., Ake, C. Jr., Phillips, T. D. y Beremand, M. N. (2003). *tri1* encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new *tri* gene. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1607-1613.
- Migheli, Q., González-Candelas, L., Dealessi, L., Camponogara, A. y Ramón-Vidal, D. (1998). Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the β -1,4-endoglucanase gene *egl1* show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Phytopathology* **88**: 673-677.
- Miller, J (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU.
- Miller, M. B. y Tang, Y. W. (2009). Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* **22**: 611-633.
- Mohr, H. y Kleinkauf, H. (1978). Alamethicin biosynthesis: acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. *Biochim Biophys Acta* **526**: 375-386.
- Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* **4**: 1-4.
- Montero, M., Sanz, L., Rey, M., Monte, E. y Llobell, A. (2005). BGN16.3, a novel acidic β -1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *FEBS J* **272**: 3441-3448.
- Montero, M., Sanz, L., Rey, M., Llobell, A. y Monte, E. (2007). Cloning and characterization of *bgn16-3*, coding for a β -1,6-glucanase expressed during *Trichoderma harzianum* mycoparasitism. *J Appl Microbiol* **103**: 1291-1300.
- Montero-Barrientos, M., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Monte, E. y Hermosa, R. (2007). The heterologous overexpression of *hsp23*, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. *Curr Genet* **52**: 45-53.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Nicolás, C., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S. y Monte, E. (2008). Overexpression of a *Trichoderma HSP70* gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. *Fungal Genet Biol* **45**: 1506-1513.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Nicolás, C. y Monte, E. (2010). Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *J Plant Physiol* **167**: 659-665.
- Morán-Diez, M. E., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Monte, E. y Hermosa, R. (2010). TvDim1 of *Trichoderma virens* is involved in redox-processes and confers resistance to oxidative stresses. *Curr Genet* **56**: 63-73.
- Mozo, T. y P. J. Hooykaas. (1991). Electroporation of megaplasms into *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol* **16**: 917-918.
- Mukherjee, M., Hadar, R., Mukherjee, P. K. y Horwitz, B. A. (2003). Homologous expression of a mutated-tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens*. *J Appl Microbiol* **95**: 861-867.
- Murashige, T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* **15**: 473-497.
- Muthumeenakshi, S., Mills, P. R., Brown, A. E. y Seaby, D. A. (1994). Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology* **140**: 769-777.

- Nagendran, S., Hallen-Adams, H. E., Paper, J. M., Aslam, N. y Walton, J. D. (2009). Reduced genomic potential for secreted plant cell-wall-degrading enzymes in the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera*, based on the secretome of *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol* **46**: 427-435.
- Nakai, K. y Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**: 34-36.
- Neuhof, T., Dieckmann, R., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M. y von Döhren, H. T. (2007). Direct identification of hydrophobins and their processing in *Trichoderma* using intact-cell MALDI-TOF MS. *FEBS J* **274**: 841-52.
- Neumann, M. J. y Dobinson, K. F. (2003). Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet Biol* **38**: 54-62.
- Newman, D. J. y Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **70**: 461-477.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von, H. G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6.
- Niessen, L., Schmidt, H. y Vogel, R. F. (2004). The use of *tri5* gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene producing species in the *Fusarium* section *Sporotrichiella*. *Int J Food Microbiol* **95**: 305-319.
- Nielsen, K. F., Grafenhan, T., Zafari, D. y Thrane, U. (2005). Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *J Agric Food Chem* **53**: 8190-8196.
- Nishiuchi, T., Masuda, D., Nakashita, H., Ichimura, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Kimura, M., Yamaguchi, I. y Yamaguchi, K. (2006). *Fusarium* phytotoxin trichothecenes have an elicitor-like activity in *Arabidopsis thaliana*, but the activity differed significantly among their molecular species. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 512-520.
- Nugent, K. G., Choffe, K. y Saville, B. J. (2004). Gene expression during ustilago maydis diploid filamentous growth: EST library creation and analyses. *Fungal Genet Biol* **41**: 349-360.
- Ondari, M. E. y Walker, K. D. (2008). The taxol pathway 10-O-acetyltransferase shows regioselective promiscuity with the oxetane hydroxyl of 4-deacetyltaxanes. *J Am Chem Soc* **130**: 17187-17194.
- Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C., Abruzzo, G., Flattery, A., Kong, L., Cabello, A., Vicente, F., Peláez, F., Díez, M. T., Martin, I., Bills, G., Giacobbe, R., Dombrowski, A., Schwartz, R., Morris, S., Harris, G., Tsiouras, A., Wilson, K. y Kurtz, M. B. (2000). Discovery of novel antifungal (1,3)- β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 368-377.
- Ochiai, N., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M. y Kimura, M. (2007). Genetically engineered *Fusarium* as a tool to evaluate the effects of environmental factors on initiation of trichothecene biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **275**: 53-61.
- Ogura, K., Koyama, T. y Sagami, H. (1997). Polyprenyl diphosphate synthases. Cholesterols: its functions and metabolism in biology and medicine. En *Subcellular biochemistry* (vol.28). Bittman, R (eds). Plenum Press, Nueva York. EE.UU. pp. 57-87.
- Panabieres, F., Amselem, J., Galiana, E. y Le Berre, J. Y. (2005). Gene identification in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica* during *in vitro* vegetative growth through expressed sequence tags. *Fungal Genet Biol* **42**: 611-623.
- Panackal, A. A., Gribskov, J. L., Staab, J. F., Kirby, K. A., Rinaldi, M. y Marr, K. A. (2006). Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* **44**: 1740-1743.
- Papadopoulou, C., Soulti, K. y Roussis, I. G. (2005). Antimicrobial activity of wine phenolic extracts. *Food Technol Biotechnol* **43**: 41-46.
- Peláez, F., Cabello, A., Platas, G., Díez, M. T., González, D., Basilio, A., Bills, G. E., Giacobbe, R. A., Schwartz, R. E., Onish, J. C., Meinz, M. S., Abruzzo, G. K., Flattery, A. M., Kong, L. y Kurtz, M. B. (2000). The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Syst Appl Microbiol* **23**: 333-343.
- Peleg, A. Y., Seifert, H. y Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**: 538-582.
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Ratto, M., Salminen, E. y Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* **61**: 155-164.

- Peplow, A. W., Tag, A. G., Garifullina, G. F. y Beremand, M. N. (2003a). Identification of new genes positively regulated by *tri10* and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2731-2736.
- Peplow, A. W., Meek, I. B., Wiles, M. C., Phillips, T. D. y Beremand, M. N. (2003b). *tri16* is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5935-5940.
- Persoon, C. H. (1794). Dispositio methodica fungorum in Classes, Ordines, Familias, et Genera. En *Neues Magazin für die Botanik*. Römer, J. J. (eds). Ziegler und Söhne, Zürich, Alemania. pp. 63-128.
- Pearson, W. R. y Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2444-2448.
- Peterbauer, C. K., Lorito, M., Hayes, C. K., Harman, G. E. y Kubicek, C. P. (1996). Molecular cloning and expression of the *nag1* gene (N-acetyl- β -D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. *Curr Genet* **30**: 325-331.
- Poetsch, A. y Wolters, D. (2008). Bacterial membrane proteomics. *Proteomics* **8**: 4100-4122.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M. N., Barreau, C. y Richard-Forget, F. (2006). Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol Lett* **258**: 102-107.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F. y Ouellet, T. (2007). Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with *tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Lett* **581**: 443-447.
- Power, T., Ortoneda, M., Morrissey, J. P. y Dobson, A. (2006). Differential expression of genes involved in iron metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *Int Microbiol* **9**: 281-287.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M. y McCormick, S. P. (1995a). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 593-601.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., McCormick, S. P. y Desjardins, A. E. (1995b). Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1923-1930.
- Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemans, M. A., Pouwels, P. H. y van den Hondel, C. A. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**: 117-124.
- Qiao, J., Liu, W. y Li, R. (2008). Antifungal resistance mechanisms of *Aspergillus*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **49**: 157-163.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. y Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* **23**: 4878-4884.
- Rahman, Z., Shida, Y., Furukawa, T., Suzuki, Y., Okada, H., Ogasawara, W. y Morikawa, Y. (2009). Application of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular β -glucosidase I. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 1083-1089.
- Ragione, F. D., Cucciolla, V., Borriello, A., Pietra, V. D., Pontoni, G., Racioppi, L., Manna, C., Galletti, P. y Zappia, V. (2000). Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 733-739.
- Ramboseck, J. A. y Leach, J. (1987). DNA recombinant in filamentous fungi progress and prospects. *Crit Rev Biotechnol* **6**: 357-93.
- Rasbery, J. M., Shan, H., LeClair, R. J., Norman, M., Matsuda, S. P. y Bartel, B. (2007). *Arabidopsis thaliana* squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. *J Biol Chem* **282**: 17002-17013.
- Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adajdi, E., Demais, S., Gorton, D., Arst, H. N Jr. y Scazzocchio, C. (1997). Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *EMBO J* **16**: 3974-3986.
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R. y Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev* **7**: 89-123.
- Reichenbach, H., Forche, E., Gerth, K., Irschik, H., Kunze, B., Sasse, F., Hoefle, G., Augustiniak, H. y Bedorf, N. (1990). Fungicidal steroids from *Trichoderma*. Patente alemana DE-3823068.

- Reithner, B., Brunner, K., Schuhmacher, R., Peissl, I., Seidl, V., Krska, R. y Zeilinger, S. (2005). The G protein α subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet Biol* **42**: 749-760.
- Rey, M., Llobell, A., Monte, E., Scala, F. y Lorito, M. (2004). Genomic of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* **4**: 225-248.
- Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap* **1**: 1-56.
- Rocha, O., Ansari, K. y Doohan, F. M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit Contam* **22**: 369-378.
- Rocha-Ramírez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. A. y Herrera-Estrella, A. (2002). *Trichoderma atroviride* G-protein α -subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot Cell* **1**: 594-605.
- Rodríguez-Concepción, M. y Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* **130**: 1079-1089.
- Rosado, I. V., Rey, M., Codón, A. C., Govantes, J., Moreno-Mateos, M. A. y Benítez, T. (2007). QID74 cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fungal Genet Biol* **44**: 950-964.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J. R. y Meyer, A. S. (2007). Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated Barley straw substrates. *Biotechnol Prog* **23**: 1270-1276.
- Rotter, B. A., Prelusky, D. B. y Pestka, J. J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health* **48**: 1-34.
- Rubio, M. B., Hermosa, M. R., Keck, E. y Monte, E. (2005). Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microb Ecol* **49**: 25-33.
- Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Hermosa, R., Gutiérrez, S. y Monte, E. (2008) Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Curr Genet* **54**: 301-312.
- Rubio, M. B., Hermosa, R., Reino, J. L., Collado, I. G. y Monte, E. (2009). *Thctf1* transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genet Biol* **46**: 17-27.
- Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E. y Christianson, D. W. (2001). Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13543-13548.
- Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Rouaissi, M., Hajlaoui, M. R., Rubio, M. B., Monte, E., Boudabous, A., y Hermosa M. R. (2009). Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Can J Microbiol* **55**: 154-162.
- Samolski, I., de Luis A, Vizcaíno J. A, Monte, E. y Suárez, M. B. (2009). Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiol*. **9**: 217.1-217.14.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* **96**: 195-206.
- Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Fiddes, J. C., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. y Smith, M. (1978). The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. *J Mol Biol* **125**: 225-246.
- Sansom, M. S. (1991). The biophysics of peptide models of ion channels. *Prog Biophys Mol Biol* **55**: 139-235.
- Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J. A., Llobell, A., Hermosa, R. y Monte, E. (2004). Cell wall degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Curr Genet* **46**: 277-286.
- Sanz, L., Montero, M., Redondo, J., Llobell, A. y Monte, E. (2005). Expression of an α -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS J* **272**: 493-499.
- Sasaki, H., Kishimoto, T., Mizuno, T., Shinzato, T. y Uemura, H. (2005). Expression of GCR1, the transcriptional activator of glycolytic enzyme genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is positively autoregulated by Gcr1p. *Yeast* **22**: 305-319.
- Savoia, D., Avanzini, C., Allice, T., Callone, E., Guella, G. y Dini, F. (2004). Antimicrobial activity of euplotin C, the sesquiterpene taxonomic marker from the marine ciliate *Euplotes crassus*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3828-3833.

- Sawicki, G. S., Rasouliyan, L., Pasta, D. J., Regelman, W. E., Wagener, J. S., Waltz, D. A. y Ren, C. L. (2008). The impact of incident methicillin resistant *Staphylococcus aureus* detection on pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **43**: 1117-23.
- Scazzocchio, C. (2000). The fungal GATA factors. *Curr Opin Microbiol* **3**: 126-131.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E. y Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4364-4370.
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N. y Geisen, R. (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiol Lett* **284**: 142-149.
- Schulze, A. y Downward, J. (2001). Navigating gene expression using microarrays a technology review. *Nat Cell Biol* **3**: 190-195.
- Schuhr, C. A., Radykewicz, T., Sagner, S., Latzel, C., Zenk, M. H., Arigoni, D., Bacher, A., Rohdich, F. y Eisenreich, W. (2003). Quantitative assessment of crosstalk between the two isoprenoid biosynthesis pathways in plants by NMR spectroscopy. *Phytochem Rev* **2**: 3-16.
- Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M. A., Oliveira, E. y Trillas, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* **7**: 3943-3952.
- Segarra, G., Van der, E. S., Trillas, I. y Pieterse, C. M. (2009). MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol* **11**: 90-96.
- Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G. y Kubicek, C. P. (2006). Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J* **273**: 4346-59.
- Sentheshanmuganathan, S. y Elsdén, S. R. (1958). The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **69**: 210-218.
- Shaban, G. M. y El-Komy, H. M. (2001). Survival and proliferation of alginate encapsulated *Trichoderma* spp. in Egyptian soil in comparison with allyl alcohol soil fumigation. *Mycopathologia* **151**: 139-146.
- Shirliff, M. E., Krom, B. P., Meijering, R. A., Peters, B. M., Zhu, J., Scheper, M. A. Harris, M. y Jabra-Rizk, M. A. (2009). Farnesol induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2392-2401.
- Shores, M., Yedidia, I. y Chet, I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* **95**: 76-84.
- Sivasithamparan, K., y Ghisalberti, E. L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol.1). Kubicek, C.P. y Harman, G. E. (eds.). Taylor and Francis, Londres. pp.139-191.
- Skinner, W., Keon, J. y Hargreaves, J. (2001). Gene information for fungal plant pathogens from expressed sequences. *Curr Opin Microbiol* **4**: 381-386.
- Smith, T. F. y Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**: 195-197.
- Smith, W. H. (1995). Forest occurrence of *Trichoderma* species: emphasis on potential organochlorine (Xenobiotic) degradation. *Ecotoxicol Environ Saf* **32**: 179-183.
- Song, X. Y., Xie, S. T., Chen, X. L., Sun, C. Y., Shi, M. y Zhang, Y. Z. (2007). Solid state fermentation for trichokonins production from *Trichoderma koningii* SMF2 and preparative purification of trichokonin VI by a simple protocol. *J Biotechnol* **131**: 209-215.
- Stafford, M. E. y McLaughlin, C. S. (1973). Trichodermin, a possible inhibitor of the termination process of protein synthesis. *J Cell Physiol* **82**: 121-128.
- Stasz, T. E., Nixon, K., Harman, G. E., Weeden, N. F. y Kuter, G. A. (1989). Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozymes polymorphism. *Mycologia* **81**: 391-403.
- Stack, D., Neville, C. y Doyle, S. (2007). Nonribosomal peptide synthesis in *Aspergillus fumigatus* and other fungi. *Microbiology* **153**: 1297-1306.
- Staswick, P. E., Yuen, G. Y. y Lehman, C. C. (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J* **15**: 747-754.

- Stoppacher, N., Zeilinger, S., Omann, M., Lassahn, P. G., Roitinger, A., Krska, R. y Schuhmacher, R. (2008). Characterisation of the peptaibome of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**: 1889-98.
- Suárez, M. B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E. y Llobell, A. (2004). Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**: 46-55.
- Suárez, M. B., Sanz, L., Chamorro, M. I., Rey, M., González, F.J., Llobell, A. y Monte, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genet Biol* **42**: 924-34.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagau, F. y Legault, J. (2006). Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J Ethnopharmacol* **103**: 99-102.
- Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L. y Vagvolgyi, C. (2005). Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* **52**: 137-168.
- Tag, A. G., Garifullina, G. F., Peplow, A. W., Ake, C., Jr., Phillips, T. D., Hohn, T. M. y Beremand, M. N. (2001). A novel regulatory gene, *tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5294-5302.
- Tao, L., Zhou, L., Zheng, L. y Yao, M. (2006). Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Chemother Pharmacol* **58**: 24-34.
- Tarus, P. K., Lang'at-Thoruwa, C. C., Wanyonyi, A. W. y Chhabra, S. C. (2003). Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. *B Chem Soc Ethiopia* **17**: 185-190.
- Tate, W. P. y Caskey, C. T. (1973). Peptidyltransferase inhibition by trichodermin. *J Biol Chem* **248**: 7970-7972.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A. y Arst, H. N Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid and alkaline expressed genes by ambient pH. *EMBO J* **14**: 779-790.
- Tokai, T., Koshino, H., Takahashi-Ando, N., Sato, M., Fujimura, M. y Kimura, M. (2007). *Fusarium tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **353**: 412-417.
- Trail, F., Xu, J. R., San, M. P., Halgren, R. G. y Kistler, H. C. (2003). Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet Biol* **38**: 187-197.
- Trapp, S. C., Hohn, T. M., McCormick, S. y Jarvis, B. B. (1998). Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. *Mol Gen Genet* **257**: 421-432.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G. y Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2474-2478.
- Tscherne, J. S. y Pestka, S. (1975). Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells. *Antimicrob Agents Chemother* **8**: 479-487.
- Uemura, H., Koshio, M., Inoue, Y., Lopez, M. C. y Baker, H. V. (1997). The role of Gcr1p in the transcriptional activation of glycolytic genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 521-532.
- Ulloa, C. J. y Peberdy, J. F. (1992). Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb Technol* **14**: 236-240.
- Van Wees, S. C., Van der Ent, S. y Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 443-448.
- Varga, J., Kocsube, S., Toth, B. y Mesterhazy, A. (2005). Nonribosomal peptide synthetase genes in the genome of *Fusarium graminearum*, causative agent of wheat head blight. *Acta Biol Hung* **56**: 375-388.
- Vicente, M. F., Cabello, A., Platas, G., Basilio, A., Díez, M. T., Dreikorn, S., Giacobbe, R. A., Onishi, J. C., Meinz, M., Kurtz, M. B., Rosenbach, M., Thompson, J., Abruzzo, G., Flattery, A., Kong, L., Tsipouras, A., Wilson, K. E. y Peláez, F. (2001). Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. *J Appl Microbiol* **91**: 806-813.
- Vicente, M. F., Basilio, A., Cabello, A. y Peláez, F. (2003). Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect* **9**: 15-32.

- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E. L., Lorito, M. y Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett Appl Microbiol* **43**: 143-148.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. y Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions in soil agro-ecosystems. *Soil Biol Biochem* **40**: 1-10.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chemin, L. y Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 549-556.
- Vizcaíno, J. A., Sanz, L., Basilio, A., Vicente, F., Gutiérrez, S., Hermosa, M. R. y Monte, E. (2005). Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three trichoderma sections. *Mycol Res* **109**: 1397-1406.
- Vizcaíno, J. A., Cardoza, R. E., Dubost, L., Bodo, B., Gutiérrez, S. y Monte, E. (2006a). Detection of peptaibols and partial cloning of a putative peptaibol synthetase gene from *T. harzianum* CECT 2413. *Folia Microbiol* **51**: 114-120.
- Vizcaíno, J. A., González, F. J., Suárez, M. B., Redondo, J., Heinrich, J., Delgado-Jarana, J., Hermosa, R., Gutiérrez, S., Monte, E., Llobell, A. y Rey, M. (2006b). Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genomics* **7**: 193.1-193.14.
- Vizcaíno, J. A., Redondo, J., Suárez, M. B., Cardoza, R. E., Hermosa, R., González, F. J., Rey, M. y Monte, E. (2007). Generation, annotation, and analysis of ESTs from four different *Trichoderma* strains grown under conditions related to biocontrol. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**: 853-862.
- Wang, D., Xia, M., Cui, Z., Tashiro, S., Onodera, S. y Ikejima, T. (2004). Cytotoxic effects of mansonone E and F isolated from *Ulmus pumila*. *Biol Pharm Bull* **27**: 1025-1030.
- Ward, T. J., Bielawski, J. P., Kistler, H. C., Sullivan, E. y O'Donnell, K. (2002). Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 9278-9283.
- Ward, M. y Brettin, T. S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol* **26**: 553-560.
- Webster, J. (1980). Introduction to fungi. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Wei, C. M., Hansen, B. S., Vaughan, M. H., Jr. y McLaughlin, C. S. (1974). Mechanism of action of the mycotoxin trichodermin, a 12,13-epoxytrichothecene. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 713-717.
- Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* **22**: 837-845.
- Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B. W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbola, D. J., Bodo, B. y Kenerley, C. (2002). Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem* **277**: 20862-20868.
- Wilhite, S. E., Lumsden, R. D. y Straney, D. C. (2001). Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5055-5062.
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M. y Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp. phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* **96**: 181-185.
- Yedidia, I., Benhamou, N. y Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1061-1070.
- Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y. y Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil* **235**: 235-242.
- Yoder, O. C. y Turgeon, B. G. (2001). Fungal genomics and pathogenicity. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 315-321.
- Yoshikawa, K., Furusawa, C., Hirasawa, T. y Shimizu, H. (2008). Genome-wide analysis of the effects of location and number of stress response elements on gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **106**: 507-510.
- Zamir, D. y Chet, I. (1985). Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Can J Bot* **31**: 578-580.
- Zeilinger, S., Ebner, A., Marosits, T., Mach, R. y Kubicek, C. P. (2001). The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the cbh2 (cellobiohydrolase II-gene) activating element. *Mol Genet Genomics* **266**: 56-63.

- Zeilinger, S. (2004). Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Curr Genet* **45**: 54-60.
- Zeilinger, S., Reithner, B., Scala, V., Peissl, I., Lorito, M. y Mach, R. L. (2005). Signal transduction by Tga3, a novel G protein α subunit of *Trichoderma atroviride*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1591-1597.
- Zeppa, G., Allegrone, G., Barbeni, M. y Guarda P. A. (1990). Variability in the production of metabolites by *Trichoderma viride*. *Ann Microbiol Enzymol* **40**: 171-176.
- Zhang, Y. B., Peng, X. Y. y Sun, H. X. (2008). A new cytotoxic, apoptosis inducing triterpenoid from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. *Chem Biodivers* **5**: 189-196.
- Zhou, X., Wang, Z., Jiang, K., Wei, Y., Lin, J., Sun, X. y Tang, K. (2007). Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **43**: 490-494.